

Aus den Forschungslaboratorien der Schering AG
Berlin/Bergkamen

UNTERSUCHUNGEN ZUR ENDOKRINEN BEEINFLUSSUNG DES ¹⁴C-TRYPTOPHAN-STOFFWECHSELS DER RATTE

Einfluß von Äthinylöstradiol, Norethisteronacetat
und anderen Gestagenen auf das
Tryptophan-Metabolitenspektrum und die
¹⁴C-Gesamtausscheidung im Harn
sowie auf die ¹⁴CO₂-Abatmung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Robert Heinrich
Göttingen

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus den Forschungslaboratorien der Schering AG
Berlin/Bergkamen

UNTERSUCHUNGEN ZUR ENDOKRINEN BEEINFLUSSUNG DES ^{14}C -TRYPTOPHAN-STOFFWECHSELS DER RATTE

Einfluß von Äthinylöstradiol, Norethisteronacetat
und anderen Gestagenen auf das
Tryptophan-Metabolitenspektrum und die
 ^{14}C -Gesamtausscheidung im Harn
sowie auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Robert Heinrich
Göttingen

Referent:

Prof. Dr. Dr. E. Gerhards

Korreferent:

Prof. Dr. P. Siegmund



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 26. 10. 1976

UNTERSUCHUNGEN ZUR ENDOKRINEN BEEINFLUSSUNG
DES ^{14}C -TRYPTOPHAN-STOFFWECHSELS DER RATTE

Einfluß von Äthinylöstradiol, Norethisteronacetat
und anderen Gestagenen auf das Tryptophan-Metaboli-
ten-Spektrum und die ^{14}C -Gesamtausscheidung im Harn
sowie auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung

	Seite
1. EINLEITUNG	2
1.1 Problemstellung	16
2. METHODIK	18
2.1 Substanzen	18
2.2 Geräte	19
2.3 Tiermaterial, Substanzapplikation und Versuchsanordnung	20
2.4 Bestimmung der ^{14}C -Gesamtausscheidung, sowie papierchromatographische Differen- zierung der Tryptophan-Metabolite im Harn	21
2.5 Bestimmung der $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung	22
3. ERGEBNISSE (Gliederung s. Seite 23 u. 24)	23
4. DISKUSSION	65
5. ZUSAMMENFASSUNG	86
6. LITERATUR	88

1. EINLEITUNG

Bereits im Jahre 1945 beschrieben KREHL et al. die Zusammenhänge im Intermediärstoffwechsel zwischen Tryptophan und Nicotinsäure (1).

NISHIZUKA und HAYAISHI zeigten 1963, daß im Stoffwechsel die Chinolinsäure ohne Bildung freier Nicotinsäure in Nicotinsäure-Ribonukleotid, die Vorstufe des NAD^+ , überführt wird (2).

Da aus Tryptophan im Intermediärstoffwechsel verschiedene biologisch wirksame Metabolite entstehen, ist die Frage der Regulation des Tryptophan-Stoffwechsels sehr wichtig und wurde daher bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht.

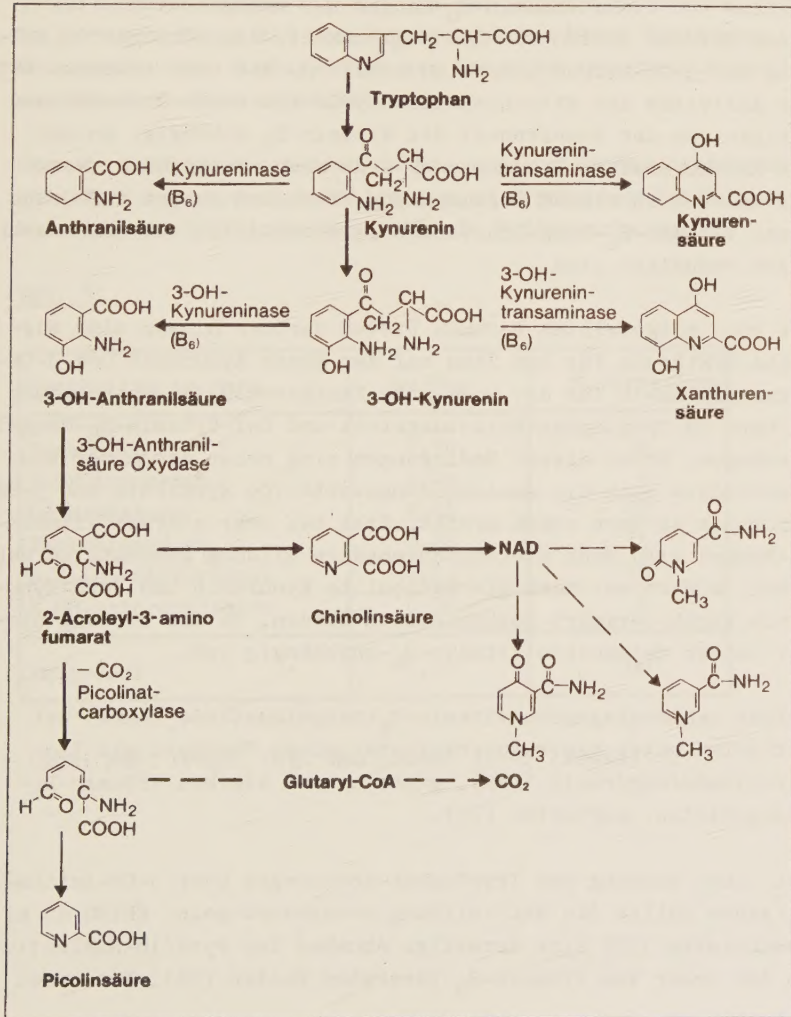
LEPKOVSKY und NIELSEN konnten schon 1942 nachweisen, daß Ratten bei Vitamin- B_6 -Mangelzuständen vermehrt Xanthurensäure im Harn ausscheiden, sie leiteten damit die vielfältigen Untersuchungen über die Abhängigkeit des Tryptophan-Stoffwechsels von Vitamin B_6 ein (3, 4).

Daraufhin führten Humanversuche zu dem Ergebnis, daß es auch beim Menschen bei Vitamin- B_6 -Mangelzuständen zu spezifischen Veränderungen des Verteilungsspektrums der Tryptophan-Metabolite im Harn kommt (5, 6, 7).

Zur Entdeckung eines latenten Vitamin- B_6 -Mangels beim Menschen kann der Tryptophan-Belastungstest benutzt werden (7, 8). Dabei erhält der nüchterne Proband oral mehrere Gramm (2 - 10 g) L-Tryptophan. Nach Verabreichung wird der Harn 8 Stunden (9, 10) bzw. 24 Stunden (11) zur Bestimmung der Harnmetabolite gesammelt.

Bei den Untersuchungen zum Mechanismus der vermehrten Xanthurensäure-Ausscheidung im Harn bei Vitamin- B_6 -Mangelzuständen führten die Arbeiten von OGASAWARA et al. (12) sowie die Ar-

beiten von WEBER und WISS (13, 14) zu einer Interpretationsmöglichkeit: das 3-OH-Kynurenin wird durch die 3-OH-Kynureninase in 3-OH-Anthranilsäure bzw. durch die 3-OH-Kynurenin-Transaminase in Xanthurensäure überführt. Siehe dazu das folgende Stoffwechselschema:



Die Aktivität dieser beiden Enzyme wird durch einen Vitamin-B₆-Mangel sehr unterschiedlich beeinflusst. Während die 3-OH-Kynureninase und die 3-OH-Kynurenin-Transaminase im Zytoplasma von Niere und Leber der Ratte bei Vitamin-B₆-Mangel in ihrer Aktivität sehr stark reduziert sind, wird im Gegensatz dazu die Aktivität der mitochondrialen 3-OH-Kynurenin-Transaminase von einem Vitamin-B₆-Mangel nur wenig beeinflusst. Diese Befunde bieten nun die Möglichkeit, die verminderte Bildung der 3-OH-Anthranilsäure zu erklären. Wie oben erwähnt, ist die Aktivität der mitochondrialen 3-OH-Kynurenin-Transaminase weniger von der Anwesenheit des Vitamin B₆ abhängig, so daß die Xanthurensäure-Bildung auch dann noch stattfindet, wenn die anderen in diesem Zusammenhang erwähnten Enzyme auf Grund eines Vitamin-B₆-Mangelzustandes in ihrer Aktivität schon sehr stark reduziert sind.

Die oben mitgeteilten Befunde bieten darüber hinaus eine mögliche Erklärung für den Stau auf der Ebene Kynurenin und 3-OH-Kynurenin sowie für die vermehrte Xanthurensäure-Ausscheidung im Harn im Tryptophan-Belastungstest und bei Vitamin-B₆-Mangelzuständen. Unter diesen Bedingungen sind neben denen der Xanthurensäure auch die Ausscheidungswerte von Kynurenin und 3-OH-Kynurenin im Harn stark erhöht. Erst bei sehr starkem Vitamin-B₆-Mangel wird auch die Xanthurensäure-Bildung gehemmt, so daß dabei im Harn nur noch die Metabolite Kynurenin und 3-OH-Kynurenin stark vermehrt ausgeschieden werden, da die Bildung dieser beiden Metabolite Vitamin-B₆-unabhängig ist.

Solche schwerwiegenden Vitamin-B₆-Mangelzustände können bei Patienten unter einer tuberkulostatischen Therapie mit Isonicotinsäurehydrazid (INH), einem extrem starken Vitamin-B₆-Antagonisten, auftreten (15).

Bei einer Hemmung des Tryptophan-Abbauweges über 3-OH-Anthranilsäure sollte die NAD⁺-Bildung vermindert sein. KRING et al. beschrieben 1952 eine derartige Abnahme der Pyridin-Nukleotide in der Leber von Vitamin-B₆-verarmten Ratten (16). Neben den

Befunden an der Ratte, die nach OGASAWARA et al. (12) sowie nach WEBER und WISS (14) interpretiert werden können, liegen Ergebnisse von Untersuchungen zum Tryptophan-Stoffwechsel bei Vitamin-B₆-Mangel vor, die sich nicht in diese Theorie einordnen lassen (17, 18, 19). Ein Nachteil der bisher veröffentlichten Untersuchungen zum Tryptophan-Stoffwechsel beim Menschen besteht darin, daß man aus der Analyse einzelner, nur in geringer Menge mit dem Harn ausgeschiedener Tryptophan-Metabolite eine Aussage über den Gesamtstoffwechsel dieser essentiellen Aminosäure macht.

Gesunde Probanden scheiden unter normalen Ernährungsbedingungen täglich nur wenige Milligramm an Tryptophan-Metaboliten aus. BENASSI (20) gab dazu folgende Mittelwerte an:

Tab. I

Metabolite im Harn	mg/Tag	% Verteilung
Kynurenin	1,14	19
3-OH-Kynurenin	0,49	8
Kynurensäure	2,83	47
Xanthurensäure	0,66	11
o-Amino-Hippursäure	0,62	10
3-OH-Anthranilsäure	0,30	5
Insgesamt	6,04	100

[aus: Rec. Progr. Org. Med. Chem. 1, 45 (1964)]

Beim Tryptophan-Belastungstest ist nur ein geringer Teil des verabreichten Tryptophans in Form von Metaboliten im Sammelurin nachweisbar.

BENASSI (20) fand bei gesunden Probanden nach einer Belastung mit 50 mg/kg KG bzw. 100 mg/kg KG folgende Werte:

Tab. II

Metabolite im Harn	50 mg/kg		100 mg/kg	
	μmol	% Vertlg.	μmol	% Vertlg.
Kynurenin	210	32	917	42
Acetylkynurenin	105	16	245	11
3-OH-Kynurenin	34	5	40	2
Kynurensäure	176	27	469	21
Xanthurensäure	41	6	87	4
3-OH-Anthranilsäure	39	14	447	20
Insgesamt	655	100	2205	100
% der Eingabe	4,6		6,7	

[aus: Rec. Progr. Org. Med. Chem. 1, 45 (1964)]

Beim Tryptophan-Belastungstest nimmt die Ausscheidung der Metabolite im Harn des Menschen mit der verabreichten Dosis zu. PRICE fand nach Verabreichung von 2 g Tryptophan 1,8 %, nach 4 g 2,7 % und nach 8 g 6,8 % der Eingabe in Form von Tryptophan-Metaboliten im Harn wieder (21).

Über die Ausscheidung der Chinolinsäure als Metabolit des Tryptophans mit dem Harn liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor. HENDERSON und HANKES wiesen 1949 als erste Chi-

nolinsäure im Rattenharn nach (22). HENDERSON und HIRSCH (23) sowie HANKES und HENDERSON (24) zeigten, daß Chinolinsäure in vivo aus 3-OH-Anthranilsäure gebildet werden kann. SUHADOLNIK et al. untersuchten in vivo und in vitro die Chinolinsäure-Bildung bei verschiedenen Species (25). Die folgende Tabelle ist dieser Arbeit entnommen und zeigt, daß Carboxy- ^{14}C -markierte Anthranilsäure durch die Leberhomogenate der verschiedenen Species in sehr unterschiedlichem Ausmaß in Chinolinsäure umgesetzt wird:

Tab. III

Species	% ^{14}C in:		% Substratumsatz in Chinolinsäure
	$^{14}\text{CO}_2$	Inkubationsansatz verbleibend	
Maus	11,0	90,0	46,3
Schwein	11,1	84,0	67,0
Ratte	12,0	81,1	80,0
Hamster	19,0	76,5	69,5
Hund	26,0	74,0	50,0
Meerschwein	31,0	49,0	42,5
Kaninchen	34,0	63,8	44,5
Taube	36,8	52,0	46,5
Rind	49,0	59,4	41,0
Katze	86,0	12,3	9,0

[aus: J. Biol. Chem. 228, 973 (1957)]

Die niedrigste Umwandlungsrate von Tryptophan in Chinolinsäure wurde bei der Katze mit 9 %, die höchste bei der Ratte mit 80 % festgestellt. Umgekehrt war die Metabolisierung zu $^{14}\text{CO}_2$ bei der Katze mit 86 % extrem hoch, während sie bei der Ratte mit 12 % sehr niedrig war. Aus dieser Arbeit geht weiter hervor, daß die 3-OH-Anthranilsäure durch Leberhomogenate von Ratten nur zu ca. 7 %, von Katzenleberhomogenaten aber zu

60 % in Picolinsäure umgesetzt wird. Daher liegt die Annahme nahe, daß der große Unterschied in der Bildung der Chinolinsäure bei Ratte und Katze in einem Aktivitätsunterschied der Picolinatcarboxylase liegt (siehe Formelschema auf Seite 3). Bei der Ratte mit hoher Umwandlungsrate von 3-OH-Anthranilsäure in Chinolinsäure wäre die Enzymaktivität der Picolinatcarboxylase niedrig, bei der Katze mit hoher Picolinsäure-Bildung entsprechend hoch. Die Aktivität dieses Enzyms würde demnach bestimmend sein, ob der Abbau der 3-OH-Anthranilsäure in Richtung Chinolinsäure und NAD^+ oder in Richtung Picolinsäure verläuft.

In vivo allerdings war nach den Untersuchungen von SUHADOLNIK et al. (25) weder bei der Katze noch bei der Ratte die Picolinsäure im Harn nach Verabreichung von ^{14}C -Tryptophan-(3 α , 7, 7 α) nachweisbar. Innerhalb dieser Versuchsreihen mit ^{14}C -Tryptophan und einer Belastungsdosis (24 mg/Ratte und 200 mg/Katze) wurden im Rattenharn 3,4 % und im Harn der Katzen 0,65 % der Eingabe als Chinolinsäure wieder ausgeschieden.

In einer weiteren ausführlichen vergleichenden Arbeit zum Tryptophan-Stoffwechsel bei Hund, Katze, Ratte und Mensch bestimmten BROWN und PRICE (26) zahlreiche Metabolite des Tryptophans im Harn dieser Species, ohne aber die Chinolinsäure zu erwähnen. Um die im folgenden Teil dieser Arbeit wichtig werdenden Ergebnisse aus den Untersuchungen von BROWN und PRICE hervorzuheben, wurden die dort angegebenen Ausscheidungsquoten von Tryptophan-Metaboliten bei der Species Ratte der Arbeit entnommen und, umgerechnet auf Prozent der Gesamtwiederfindung, in der nachstehenden Tabelle gegenübergestellt.

Tab. IV

Metabolit	1. Tag unbelastet		2. Tag belastet (60 mg $\pm$ 310 μ Mol Tryptophan p.o.)	
	Wiederfindung im 24 h Sammelharn		Wiederfindung in 24 h Sammelharn	
	μ Mol	% der Gesamt-wiederfindung	μ Mol	% der Gesamt-wiederfindung
Aromat.Verbindg. (undefiniert)	0,5	8,3	0,6	0,6
Anthranilsäure-glukuronid	0,6	10,0	9,9	10,5
o-Amino-Hippur-säure	0,8	13,3	3,3	3,5
Anthranilsäure	3,2	53,5	10,7	11,4
Acetylkynurenin	0,0	--	2,6	2,8
Kynurenin	0,5	8,3	18,4	19,5
Kynurensäure	0,1	1,7	43,6	46,3
Xanthurensäure	0,3	5,0	5,3	5,6
Gesamt-wiederfindung	6,0 μ Mol		94,4 μ Mol	

[aus: J.Biol.Chem. 219, 985 (1956)]

Nach Tabelle IV ist unter normalen Ernährungsbedingungen die Anthranilsäure mit ca. 50 % der Haupt-Tryptophan-Metabolit im Rattenharn. Nach oraler Belastung mit 0,3 mMol $\pm$ 60 mg Tryptophan werden in 24 Stunden ca. 30 % der Eingabe mit dem Harn eliminiert, dabei entfielen von den von den Autoren erfaßten Tryptophan-Metaboliten ca. 50 % auf Kynurensäure. Die Chinolinsäure wurde als Tryptophan-Metabolit von den Autoren nicht bestimmt.

Die endokrine Beeinflussung des Tryptophan-Stoffwechsels ist außerordentlich vielfältig. In diesem Zusammenhang soll auf die bekannte Induktion der Tryptophan-Pyrrolase durch Kortikosteroide nur hingewiesen werden (27 - 33). In den letzten Jahren konnte von verschiedenen Autoren gezeigt werden, daß das Wachstumshormon STH die Induzierbarkeit der Tryptophan-

Pyrrolase durch Kortikosteroide hemmt (34 - 36). Wenig Beachtung hat die Beziehung zwischen Insulin und dem Tryptophan-Stoffwechsel gefunden. Nach Untersuchungen von IKEDA et al. (37) ist bei Alloxan-diabetischen und pankreatektomierten Ratten die Aktivität der Picolinatcarboxylase in der Leber deutlich erhöht. Bei Insulin-Mangelzuständen ist dadurch die NAD^+ -Synthese aus Tryptophan vermindert. Durch Insulin-Substitution wird diese Veränderung der Metabolisierung des Tryptophan wieder aufgehoben (38).

In zahlreichen Arbeiten wurde die Beeinflussung des Tryptophan-Stoffwechsels durch Östrogene und Gestagene untersucht. So wurde z. B. festgestellt, daß die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase bei trächtigen Ratten deutlich zunimmt (39, 40), eine Kombination von Progesteron und Östron bei der Ratte aber keine Aktivitätssteigerung der Tryptophan-Pyrrolase verursacht (40). ROSE und BROWN zeigten, daß durch Progesteronbehandlung die Tryptophan-Pyrrolase gehemmt wird (18). Durch die Kombination von Mestranol mit Norethynodrel wird jedoch die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase in der Rattenleber erhöht.

Das Hauptinteresse der Untersucher fanden die Auswirkungen von Östrogen und/oder Gestagen-Applikationen auf den menschlichen Tryptophan-Metabolismus. Dabei beschrieben die Autoren die Störungen des Tryptophan-Stoffwechsels bei Frauen, die oral hormonelle Kontrazeptiva verschiedener Zusammensetzung eingenommen hatten. Diese Stoffwechselalterationen wurden in der Mehrzahl der Fälle nach einer oralen Belastungsdosis von L-Tryptophan und Identifikation einiger Tryptophan-Metabolite im Sammelurin festgestellt (41, 42). Diese Veränderungen wurden dadurch charakterisiert gefunden, daß vermehrt Tryptophan-Metabolite im Harn gefunden wurden, wie z. B. Xanthurensäure (43, 45, 46), 3-OH-Kynurenin (43, 46, 48), Kynurensäure (43, 46, 48), Acetylkynurenin (43, 46) und 3-OH-Anthranilsäure (44, 47, 48). In der folgenden Zeit konnten diese Ergebnisse durch weitere Untersuchungen gestützt werden (49, 50). Es stellte sich aber auch heraus, daß unter dem Einfluß oraler Kontrazeptiva ebenfalls vermehrt Metabolite des Tryptophan-Nicotinsäure-

re-Stoffwechselweges ausgeschieden werden (51). Dabei wurde erstmalig gezeigt, daß auch die Exkretion von N¹-Methylnicotinamid, einem Endprodukt des Tryptophan-Nicotinsäure-Stoffwechselweges, bei Frauen erhöht ist, die orale Kontrazeptiva, in diesem Falle Enovid-E, eingenommen hatten. WOLF berichtete, daß nach der Gabe reiner Östrogene zwei Nicotinsäure-Metabolite, nämlich N¹-Methylnicotinamid und 2-Pyridon, vermehrt ausgeschieden wurden (52).

Der Einfluß der Östrogen-Komponente wurde in der Folgezeit untersucht, als man die Ausscheidung von Tryptophan-Metaboliten bei verschiedenen Gruppen von Frauen untersuchte, die orale Kontrazeptiva mit niedriger Östrogendosis (0,05 mg Äthinylöstradiol oder 0,05 mg Mestranol) über verschieden lange Zeiträume (3 bzw. 6 - 16 Monate) erhielten bzw. ein Präparat mit einer höheren Östrogendosis (0,1 mg Mestranol). Dabei ergaben sich Anhaltspunkte dafür, daß das Ausmaß der Tryptophan-Stoffwechselstörung sowohl von der Höhe des Östrogenanteils des Kontrazeptivums als auch von der Dauer seiner Applikation abhängt (53, 54).

Neueren Datums ist die Feststellung von ROSE und TOSELAND, daß Frauen nach Einnahme oraler Kontrazeptiva auch vermehrt Chinolinsäure ausscheiden (55). Da heute für die Veränderungen im Tryptophan-Stoffwechsel unter dem Einfluß Östrogen-Gestagen-haltiger Kontrazeptiva im wesentlichen die Östrogen-Komponente verantwortlich gemacht wird, soll im folgenden der bisher in der Literatur beschriebene Einfluß der Östrogene und der Gestagene auf den Tryptophan-Stoffwechsel getrennt abgehandelt werden.

Eine stark vermehrte Ausscheidung der Tryptophan-Metabolite Xanthurensäure und 3-OH-Kynurenin im Harn weiblicher und männlicher Versuchspersonen, die mit Äthinylöstradiol behandelt worden waren, konnte ROSE im Jahre 1966 feststellen (44). Bei einem Teil der Probanden war auch die Ausscheidung von 3-OH-Anthranilsäure erhöht. Den gleichen Effekt konnte ROSE

gleichzeitig auch an einer männlichen Versuchsperson demonstrieren, die während einer Behandlungszeit von 5 Wochen mit Äthinylöstradiol behandelt wurde: Vom 7. Behandlungstag an nahm die Ausscheidung der Xanthurensäure und des 3-OH-Kynurenins kontinuierlich zu und fiel nach Absetzen der Hormontherapie schnell wieder auf normale Werte ab (44). Beim Vergleich zweier Behandlungsgruppen, von denen die eine mit Äthinylöstradiol bzw. Stilböstrol, die andere mit oralen Kontrazeptiva verschiedener Östrogen-Gestagen-Zusammensetzung behandelt worden war, stellte sich heraus, daß die Ausscheidung folgender Metabolite bei beiden Behandlungsgruppen stark erhöht war: Kynurenin, 3-OH-Kynurenin, Xanthurensäure und 3-OH-Anthranilsäure (48).

Ähnliche Ergebnisse liegen von BROWN et al. aus dem Jahre 1969 vor (46), als die Tryptophan-Metaboliten-Spektren im Harn zweier Behandlungsgruppen verglichen wurden, von denen die eine nur mit Östrogenen, die andere mit einer Östrogen-Gestagen-Kombination behandelt worden war. Dabei ergab sich auch, daß sich nach alleiniger Östrogenbehandlung die erhöhten Ausscheidungsraten von Kynurenin und 3-OH-Kynurenin, Acetylkynurenin, Kynurensäure und 3-OH-Anthranilsäure nur unwesentlich von denen der Gruppe, die mit Kombinationspräparaten behandelt worden war, unterschieden.

Weitergehende Arbeiten von WOLF aus dem Jahre 1969 (52) ergaben, daß die Behandlung männlicher Versuchspersonen mit synthetischen Östrogenen wie Stilböstrol bzw. Chlorotrianisen [Chloro-tris(p-methoxyphenyl)-äthylen] nach einer oralen Belastungsdosis von 2 g L-Tryptophan zu einer stark erhöhten Ausscheidung von N¹-methylnicotinamid und N-methyl-2-pyridon-5-carboxamid (= 2-Pyridon) führte. Aus späteren Versuchsreihen, die die bisher beschriebenen Ergebnisse stützten, ergaben sich darüber hinaus Anzeichen dafür, daß die Höhe der N¹-methylnicotinamid und 2-Pyridon-Ausscheidung im Harn männlicher Probanden unabhängig ist von der Länge des Vorbehandlungszeitraums mit Östrogenen (56). Ähnliche Versuchsergebnisse wurden

von ROSE und BRAIDMAN 1971 veröffentlicht, die bei mit Östrogenen behandelten Frauen eine vermehrte Exkretion des Metaboliten N¹-methyl-nicotinamid beschrieben, jedoch gleichzeitig keine vermehrte Ausscheidung des Metaboliten 2-Pyridon fanden (57).

Die bei Einnahme von oralen Kontrazeptiva auftretenden Störungen des Tryptophan-Stoffwechsels, die durch ganz spezifische Veränderungen des quantitativen Verteilungsmusters der Tryptophan-Metabolite im Harn gekennzeichnet sind, und die Möglichkeit ihrer Korrektur durch gleichzeitige Gabe von Pyridoxin (Vitamin B₆) wurden von verschiedenen Autoren beschrieben. Eine starke Senkung der erhöhten Xanthurensäure-Ausscheidung durch Applikation von Pyridoxin konnte ROSE 1965 zeigen (41), ebenso gelang es ihm nachzuweisen, daß auch die erhöhte Ausscheidung von 3-OH-Kynurenin und 3-OH-Anthranilsäure nach Pyridoxin-Verabreichung wieder auf annähernd normale Werte zurückgeht (44). PRICE et al. bestätigten diese Effekte und berichteten darüber hinaus, daß sich auch die erhöhten Ausscheidungswerte von Kynurenin, Acetylkynurenin und Kynurensäure durch die Gabe von Pyridoxin annähernd normalisieren ließen, wobei jedoch die Xanthurensäure-Ausscheidung noch über den Kontrollwerten blieb (58). Ähnliche Untersuchungsergebnisse mit unterschiedlichen Vitaminsupplementationsdosen und Applikationszeiträumen liegen auch aus Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen vor (45, 46, 53). TOSELAND und PRICE konnten eine vermehrte Ausscheidung von 3-OH-Anthranilsäure im Harn von Frauen, die orale Kontrazeptiva eingenommen hatten, auch ohne vorherige Belastungsdosis mit L-Tryptophan feststellen, wobei sich diese Störung ebenfalls durch Applikation hoher Dosen Pyridoxin wieder aufheben ließ (47). Da die Angaben über die angewandten Substituierungsdosen von Vitamin B₆ von Autor zu Autor schwankten, untersuchten LUHBY et al. die Abhängigkeit der Höhe der Xanthurensäure-Ausscheidung von der zugeführten Menge Pyridoxin. Als Ergebnis ihrer Versuchsreihen empfahlen sie zur Beseitigung dieser Stoffwechselstörung durch hormonelle Kontrazeptiva eine tägliche

Zufuhr von 30 mg Pyridoxin (49). Die Störungen der Tryptophan-Metabolisierung treten auch nach alleiniger Gabe von Östrogenen auf, können aber dann ebenfalls durch die Applikation von Pyridoxin korrigiert werden (44, 46). Einen wesentlichen Teil dieser Ergebnisse konnten WOLF et al. auch an männlichen Versuchspersonen nachvollziehen. Als interessanter Aspekt stellte sich dabei zusätzlich noch heraus, daß sich die gesteigerte Ausscheidung der Nicotinsäure-Metabolite N¹-methylnicotinamid und 2-Pyridon nicht durch Pyridoxin-Applikation beeinflussen ließ (56, 59).

Obgleich die Mehrzahl der Untersuchungen zum Einfluß von Geschlechtshormonen auf den Tryptophan-Stoffwechsel des Menschen mit oralen Kontrazeptiva, d. h. Kombinationspräparaten mit östrogenen und gestagenen Komponente, gemacht wurden, liegen auch Arbeiten vor, die sich mit den Auswirkungen der Applikation von Steroiden mit nur gestagener Wirkung beim Menschen beschäftigen. Im Jahre 1969 wurden von BROWN et al. Untersuchungsergebnisse veröffentlicht, die darauf schließen lassen, daß die Gabe von Gestagenen allein einen zu vernachlässigenden kleinen Effekt auf die Ausscheidungsraten der Hauptmetabolite des Tryptophans bewirkt. Es gelang ihnen nachzuweisen, daß diese Tatsache geschlechtsunabhängig ist, wobei die Gesamtausscheidung bei männlichen und weiblichen Probanden nur sehr geringe Unterschiede zeigte (46). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Autoren. Es ergab sich dabei, daß nach der Gabe des Gestagens Norlutat[®] (17 α -Äthinyl-19-nortestosteron) in einer Dosis von 5 mg/die bzw. SC 9022 Searle [17 α -(2-Methallyl)-19-nortestosteron] in einer Dosis von 400 mg/die über verschieden lange Zeiträume weder vor noch nach einer 2 g L-Tryptophan-Belastungsdosis eine vermehrte Ausscheidung der wesentlichen Tryptophan-Metabolite zu beobachten war. Andererseits wurde aber darauf hingewiesen, daß sich immer eine verminderte Ausscheidung des 2-Pyridon (N¹-methyl-2-pyridon-5-carboxamid) zeigte (52, 56). Ähnliche Beobachtungen beschrieben WOLF et al. nach Untersuchungen an männlichen Versuchspersonen, die z. B. wegen benigner Prostata-

hyperplasie mit Gestagenen behandelt wurden. Es konnte gezeigt werden, daß auch nach einer 23wöchigen Therapie mit Norlutat[®] bzw. SC 9022 (s. o.) keine signifikante Steigerung der Ausscheidung von Tryptophan- oder Anthranilsäure-Metaboliten (z.B. o-Amino-Hippursäure) auftrat, dafür aber ebenfalls die Ausscheidung von N¹-methyl-nicotinamid und 2-Pyridon stark gesenkt wurde (59). Versuche mit anderen Gestagenen führten zu gleichartigen Ergebnissen. ROSE und BRAIDMAN untersuchten die Wirkung von Megestrolacetat, wobei sich herausstellte, daß auch die Gabe dieses Gestagens keinen Einfluß auf die quantitativen Ausscheidungsverhältnisse der Hauptmetabolite des Tryptophans hat und daß die, durch Östrogen-Applikation erreichbare, vermehrte Ausscheidung von N¹-methyl-nicotinamid durch Gabe von Gestagenen nicht zu erreichen ist (57). Auch die langdauernde Verabreichung von Megestrolacetat (3 - 23 Monate) führte nicht zu einer Steigerung der Tryptophan-Metaboliten-Ausscheidung im Harn der Frauen (53). Zusammenfassend ist festzustellen, daß offensichtlich die unter dem Einfluß Östrogen-Gestagen-haltiger Kontrazeptiva beschriebenen Veränderungen des Tryptophan-Stoffwechsels auf die östrogene Komponente zurückzuführen sind. Es ist festzuhalten, daß unter der Behandlung mit Östrogenen nach einer Tryptophan-Belastungsdosis beim Menschen nicht nur Xanthurensäure vermehrt im Harn auftritt, sondern auch Metabolite des Tryptophan-Nicotinsäure-Stoffwechselweges vermehrt ausgeschieden werden.

Anders als bei den oben beschriebenen Geschlechtshormonen, den Östrogen und Gestagenen, ist bisher wenig über die Auswirkungen von Androgenen auf den Tryptophan-Stoffwechsel des Menschen bekannt. Untersuchungen an männlichen Probanden haben gezeigt, daß die Verabreichung von 17 α -Methyltestosteron einen leichten Anstieg der Ausscheidungsraten der harnpflichtigen Tryptophan-Metabolite mit sich bringt, wenn die Probanden oral mit L-Tryptophan belastet wurden (57, 60). Demgegenüber hat die Behandlung mit dem Androgen Mesterolone (1 α -Methyl-5 α -androstan-17 β -ol-3-on) einen genau gegenteiligen Effekt: sie senkt die Ausscheidung der Tryptophan-Metabolite. Als mög-

licherweise verantwortlich für diesen Unterschied zwischen 17 α -Methyltestosteron und Mesterolol wird von den Autoren die Tatsache diskutiert, daß 17 α -Methyltestosteron im Gegensatz zu Mesterolol eine Δ^4 -3-oxo-Gruppe besitzt, die eine Aromatisierung des A-Ringes zuläßt und damit die Bildung Östrogen-wirksamer Derivate (19). Im Tierversuch ist es gelungen, Einflüsse von Androgenen auf Tryptophan-metabolisierende Enzymsysteme festzustellen. So berichteten GLUECKSOHN-WAELSCH et al. 1967 von einer Aktivitätssteigerung der N¹-Methyl-nicotinamid-Oxydase bei weiblichen Mäusen, nachdem diese Testosteron (1 mg/die, s. c.) appliziert bekommen hatten (61). HUFF und CHAYKIN konnten diese Ergebnisse grundsätzlich bestätigen und fanden darüber hinaus eine gesteigerte Aktivität der N¹-Methyl-nicotinamid-Oxydase von weiblichen Mäusen nach subcutaner Verabreichung von 0,1 mg Testosteron-propionat. Sie wiesen einen gleichartigen Effekt auch an kastrierten männlichen Mäusen nach (62).

1.1 Problemstellung

In den folgenden Untersuchungen sollte der östrogene und gestagene Einfluß auf den Tryptophan-Stoffwechsel der Ratte untersucht werden. Es sollte nach oraler Verabreichung von ¹⁴C-markiertem Tryptophan neben dem Metabolitenspektrum und der ¹⁴C-Gesamtausscheidung im Harn auch die ¹⁴CO₂-Abatmung gemessen werden.

Für die Versuche stand DL-[¹⁴C-(ul-Benzolring)]-Tryptophan und nicht radioaktiv markiertes L-Tryptophan zur Verfügung. HANKES et al. (63) zeigten, daß die Ratte L- und D-Tryptophan in gleicher Intensität metabolisiert, daß beide Isomere zu etwa der gleichen Chinolinsäure-Ausscheidung im Harn führen und daß der Endabbau zu CO₂ bei beiden Isomeren gleich groß ist.

Aufgrund der Untersuchungen von HANKES et al. konnte in der vorliegenden Arbeit mit einer Tracerdosis von $[^{14}\text{C}]$ -DL-Tryptophan zusammen mit einer hohen Dosis nicht markiertem L-Tryptophan gearbeitet werden.

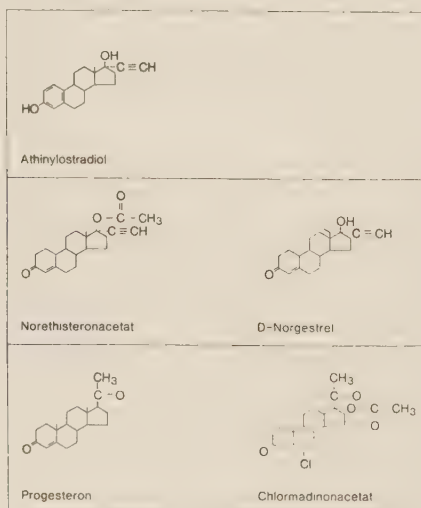
Es sollte der Einfluß des in zahlreichen oralen Kontrazeptiva enthaltenen Östrogens Äthinylöstradiol allein und in Kombination mit dem ebenfalls in oralen Kontrazeptiva enthaltenen Gestagens Norethisteronacetat auf den Tryptophan-Stoffwechsel der weiblichen Ratte untersucht werden. Außerdem sollte der Einfluß von Norethisteronacetat und anderen Gestagenen auf den Tryptophan-Stoffwechsel der Ratte untersucht werden.

2. METHODIK

2.1 Substanzen

17 α -Äthinylostradiol *	Fa. Schering AG, Berlin
Norethisteronacetat *	Fa. Schering AG, Berlin
Chlormadinonacetat *	Fa. Merck AG, Darmstadt, BRD
D-Norgestrel *	Fa. Schering AG, Berlin
Progesteron *	Fa. Schering AG, Berlin
L-Tryptophan	Dtsch. Ajimoto GmbH, Hamburg, BRD
L-Leucin	Dtsch. Ajimoto GmbH, Hamburg, BRD
DL-[¹⁴ C-(ul-Benzolring)]- Tryptophan	Fa. Amersham, Großbritannien
L-Leucin-[1- ¹⁴ C]	Fa. New England Nuclear, Boston, Mass., USA
Pyridoxin-Hydrochlorid	Fa. Merck AG, Darmstadt, BRD
L-Penicillamin	Fa. Heyl und Co., Berlin

(* siehe Formelsammlung)



Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat sowie Chlormadinonacetat und D-Norgestrel wurden für die orale Applikation in H₂O mit 0,9 % NaCl, 85 mg% Myrj und 250 mg% Carboxymethylcellulose suspendiert. Für die subcutane Applikation wurden D-Norgestrel bzw. Progesteron in Rizinusöl/Benzylbenzoat = 6 : 4 [v/v] suspendiert.

L-Tryptophan, [¹⁴C]-DL-Tryptophan, L-Leucin und L-Leucin-[1-¹⁴C] wurden in Wasser (pH 7), Pyridoxin-Hydrochlorid und L-Penicillamin in 0,1 ml bzw. bei oraler Applikation von Pyridoxin-Hydrochlorid in 1 ml Phosphatpuffer nach SØRENSEN (pH 7,2) gelöst.

2.2 Geräte

Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer, Modell 3375, Packard Instruments, Illinois, USA.

Szintillatorlösung (100 g Naphtalin, 10 g PPO, 250 mg POPOP in 1 Liter Dioxan, reinst).

Quantitative Auswertung der Chromatographiestreifen:
Doppelgasstromzählrohr, Modell LB 6200, Fa. Bertold, Wildbad, BRD.

Strahlenmeßgerät, Modell FH 49 A, Fa. Friesseke und Hoepfner, Erlangen, BRD.

Potentiometerschreiber Modell Servogor-S, Fa. Metrawatt, Nürnberg, BRD.

Stoffwechselkäfige der Fa. Microchemicals Specialities Co. (MISCO), Berkeley, Calif., USA.

2.3 Tiermaterial, Substanzapplikation und Versuchsanordnung

Es wurden, wenn nicht anders vermerkt, weibliche Wistar-Ratten (Fa. Spiegel, Hannover, BRD) mit einem Gewicht zu Versuchsbeginn von 120 - 150 g eingesetzt. Die Tiere erhielten Altromin-Futter (Fa. Altrogge, Lage/Lippe, BRD) und Wasser ad libitum. Während der Behandlung wurden jeweils 4 Tiere zusammen in Makrolonkäfigen bei normalem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Verabreichung der Steroide erfolgte in 24stündigen Abständen am Vormittag, entweder oral oder subcutan (Steroid-Trägermedien, siehe unter 2.1, S. 18, dieser Arbeit).

Die Suspension A enthielt 0,12 mg Äthinylöstradiol (Ae) + 10 mg Norethisteronacetat (NET-Ac) pro ml. Die Suspension B enthielt 0,025 mg Ae + 2 mg NET-Ac pro ml. Von den Suspensionen A und B wurden täglich 0,5 ml pro 100 g Körpergewicht (KG) appliziert, das entspricht bei der Suspension A 0,06 mg Ae + 5 mg NET-Ac, bei Suspension B 0,0125 mg Ae + 1 mg NET-Ac pro 100 g KG. Die Kontrolltiere erhielten das Trägermedium täglich per os.

Bei subcutaner Applikation der Hormone Progesteron und D-Norgestrel enthielten die Suspensionen 20 mg/ml, davon wurde täglich 0,1 ml pro 100 g KG subcutan verabreicht, das entspricht einer täglichen Hormongabe von 2 mg/100 g KG. Die Kontrolltiere dieser Versuchsgruppen erhielten das Trägermedium täglich subcutan.

Pyridoxin-Hydrochlorid wurde bei subcutaner Verabreichung in 0,1 ml Phosphatpuffer nach SØRENSEN (pH 7,2) gelöst und, wie bei den Einzelversuchen beschrieben, appliziert. Bei oraler Applikation von Pyridoxin-Hydrochlorid war die verabreichte Dosis in 1 ml Phosphatpuffer nach SØRENSEN gelöst. L-Penicillamin wurde bei intraperitonealer Verabreichung in Phosphatpuffer nach SØRENSEN gelöst.

Die Tiere erhielten am Versuchstag 3 Stunden nach der letzten

Hormonapplikation oral als wässrige Lösung (pH 7) $5 \mu\text{C}$ [^{14}C]-DL-Tryptophan ($\approx 19,6 \mu\text{g}$) allein oder in Verbindung mit 30 mg L-Tryptophan. Nach der Tryptophan-Gabe wurden die Tiere sofort einzeln in Stoffwechselkäfige gesetzt, wo sie 24 Stunden verblieben. Während dieser Zeit wurden Urin und Faeces getrennt gesammelt. Die Harnsammelgefäße wurden vor Beginn des Versuchs mit je 5 ml einer wässrigen Penicillin-Lösung (500 E/ml) beschickt. Während der Harnsammelperiode erhielten die Tiere zerkleinertes Futter und Wasser ad libitum. Nach Abschluß der Harnsammelperiode wurde die Gesamtradioaktivität sowie deren prozentuale Verteilung auf die einzelnen Metabolite nach papierchromatographischer Differenzierung gemessen.

2.4 Bestimmung der ^{14}C -Gesamtausscheidung sowie papierchromatographische Differenzierung der Tryptophan-Metabolite im Harn

Die Gesamt- ^{14}C -Elimination im Harn wurde in aliquoten Teilen der 24-Stunden-Harne gemessen, d. h. nach Bestimmung des Gesamtvolumens wurden Doppelproben zu je 0,2 ml Harn mit 3 ml Methanol (p.a.) und 17 ml Szintillatorlösung zur Messung gebracht. Die Berechnung erfolgte gegen die jeweils für jede Versuchsgruppe separat ermittelten Werte der verabreichten Gesamtradioaktivität.

Zur papierchromatographischen Differenzierung und prozentualen Verteilung der Radioaktivität im Harn wurden jeweils 0,5 ml der 24-Stunden-Harne bei 37°C im N_2 -Strom auf etwa 0,2 ml eingengt und direkt auf Papier aufgetragen. Nach Ermittlung der prozentualen Verteilung der Radioaktivität durch Papierchromatographie wurden die entsprechenden Papierbereiche mit der Schere zerschnitten und die radioaktiven Verbindungen eluiert: Zerkleinerung der jeweiligen Papierbereiche und dreimalige Extraktion mit Methanol/Wasser 6 : 4 [v/v]. Vor der Methanolzugabe wurden die Papierschnitzel

mit der entsprechenden Wassermenge 15 Minuten bei Zimmertemperatur gehalten. Die vereinigten Methanol-Wasser-Extrakte wurden am Rotationsverdampfer zum Trocknen gebracht. Nach Wiederauflösung in 0,2 ml Aqua bidest. wurden die Extrakte auf Papier rechromatographiert.

Papierchromatographie:

System nach Patridge: n-Butanol/Wasser/Eisessig 4 : 5 : 1 [v/v]

Papier: Whatman No. 1

Es wurde mit der oberen Phase des Patridge-Systems 16 Stunden absteigend bei $22^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{ C}$ chromatographiert.

Das System wurde für jede Chromatographie neu bereitet, der Chromatographietank jeweils neu äquilibriert.

2.5 Bestimmung der $^{14}\text{CO}_2$ -Atemung

Zur Bestimmung der $^{14}\text{CO}_2$ -Elimination mit der Atemluft wurden die Ratten nach oraler Verabreichung von

- a) $5 \mu\text{C}$ [^{14}C]-DL-Tryptophan ($\approx 19,6 \mu\text{g}$) allein oder in Verbindung mit 30 mg L-Tryptophan bzw.
- b) $5 \mu\text{C}$ L-Leucin-[$1\text{-}^{14}\text{C}$] ($\approx 12,4 \mu\text{g}$) allein oder in Verbindung mit 19,2 mg L-Leucin, äquimolar zu 30 mg L-Tryptophan

einzelnen bis zu 9 Stunden in Witt'schen Töpfen gehalten. Das abgeatmete $^{14}\text{CO}_2$ wurde mit einem konstanten Luftstrom unter leichtem Vakuum in 100 ml einer 12 %igen methanolischen Äthanolamin-Lösung überführt. Diese Vorlage wurde für die Messung der Tryptophan-Veratmung nach 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 9 Stunden gewechselt. Zur Radioaktivitätsmessung wurden 4 ml der Äthanolamin-Lösung mit 1 ml Methanol und 15 ml wässrigem Szintillator versetzt.

3. ERGEBNISSE

- 3.1 Einfluß der Kombination Äthinylöstradiol (Ae) und Norethisteronacetat (NET-Ac) in hoher Dosierung auf das Tryptophan-Metabolitenspektrum im Harn weiblicher Ratten
 - 3.1.1 nach Tryptophan-Belastung
 - 3.1.2 nach einer Tryptophan-Tracerdosis
- 3.2 Einfluß der Steroid-Einzelkomponenten in hoher Dosierung
 - 3.2.1 Einfluß von Äthinylöstradiol
 - 3.2.2 Einfluß von Norethisteronacetat
- 3.3 Einfluß der Kombination Äthinylöstradiol-Norethisteronacetat in niedriger Dosierung
- 3.4 ^{14}C -Tryptophan-Stoffwechsel bei männlichen, weiblichen und ovariectomierten Ratten
- 3.5 Einfluß der Gravidität auf den ^{14}C -Tryptophan-Stoffwechsel der Ratte
- 3.6 ^{14}C -Tryptophan-Stoffwechsel bei intakten, adrenalectomierten und Kortikoid-substituierten weiblichen Ratten
- 3.7 Einfluß von L-Penicillamin auf den ^{14}C -Tryptophan-Stoffwechsel der weiblichen Ratte, allein und in Kombination mit Vitamin B_6
- 3.8 Einfluß von Vitamin B_6 auf das ^{14}C -Tryptophan-Metabolitenspektrum im Harn weiblicher Ratten unter dem Einfluß von Äthinylöstradiol und/oder Norethisteronacetat
- 3.9 ^{14}C -Gesamtausscheidung im Harn nach oraler Verabreichung von ^{14}C -Tryptophan
 - bei intakten und graviden weiblichen Ratten,
 - unter dem Einfluß von L-Penicillamin allein und kombiniert mit Vitamin B_6 ,

- unter dem Einfluß von Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat, kombiniert in hoher und niedriger Dosierung bzw. als Einzelkomponenten sowie in Kombination der Steroide mit Vitamin B₆
- 3.10 ¹⁴C-Gesamtausscheidung im Harn nach oraler Verabreichung von ¹⁴C-Tryptophan bei:
 - intakten und ovariectomierten weiblichen Ratten,
 - intakten weiblichen und männlichen Ratten,
 - intakten und adrenalectomierten weiblichen Ratten,
 - intakten und adrenalectomierten und Kortikoid-substituierten weiblichen Ratten
- 3.11 ¹⁴CO₂-Ausatmung nach oraler Verabreichung von ¹⁴C-Tryptophan
 - 3.11.1 unter dem Einfluß der hochdosierten Äthinylöstradiol-Norethisteronacetat-Kombination bei hoher bzw. einer Tracerdosierung von ¹⁴C-Tryptophan
 - 3.11.2 unter dem Einfluß von L-Penicillamin, Vitamin B₆ und unter deren Kombination
 - 3.11.3 bei intakten und ovariectomierten weiblichen und bei männlichen Ratten
 - 3.11.4 bei intakten und adrenalectomierten sowie bei Kortikoid-substituierten weiblichen Ratten
- 3.12 Einfluß der Gestagene Progesteron, Chlormadinonacetat und D-Norgestrel auf den ¹⁴C-Tryptophan-Stoffwechsel der weiblichen Ratte, gemessen an der
 - ¹⁴C-Metaboliten-Verteilung im Harn,
 - ¹⁴C-Gesamtelimination über den Harn
- 3.13 ¹⁴CO₂-Ausatmung nach oraler Verabreichung von L-Leucin-[1-¹⁴C] bei weiblichen Ratten nach Behandlung mit Norethisteronacetat allein und in Kombination mit Vitamin B₆

3. ERGEBNISSE

3.1 Einfluß der Kombination Äthinylöstradiol (Ae) und Norethisteronacetat (NET-Ac) in hoher Dosierung auf das Tryptophan-Metabolitenspektrum im Harn weiblicher Ratten

Die Ratten erhielten täglich oral über 7, 9, 13, 15, 19 und 21 Tage 0,06 mg Ae und 5 mg NET-Ac pro 100 g KG. Die Tryptophan-Verabreichung (30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 μ C [14 C]-DL-Tryptophan) erfolgte jeweils am letzten Behandlungstag, 3 Stunden nach Gabe der Steroidkombination. Abb. 1 zeigt als Beispiel die Verteilung der Radioaktivität im Harn einer unbehandelten Ratte nach papierchromatographischer Differenzierung.



Abb. 1: Verteilung der Radioaktivität im Rattenharn nach Papierchromatographie.
Verabreichung: 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 μ C [14 C]-DL-Tryptophan oral. (Zone I entsprach chromatographisch authentischer Chinolinsäure.)

3.1.1 Einfluß der Kombination Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat in hoher Dosierung auf das Tryptophan-Metabolitenspektrum im Harn weiblicher Ratten nach Tryptophan-Belastung-----

Tab. V zeigt die prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Rattenharn nach oraler Tryptophan-Verabreichung in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit der Steroidsuspension A (Tab. V, s. Seite 27).

Der Zone I (Chinolinsäure) entsprachen bei den Kontrolltieren im Mittel 45 % der Radioaktivität im Harn. Die Zonen II + III waren papierchromatographisch in dem verwendeten System nicht eindeutig trennbar und wurden daher zur Auswertung zusammengefaßt. Auf die Zone II + III entfielen im Mittel 26 % der Radioaktivität im Harn. Bei allen Kontrolltieren entsprach die Radioaktivität im Bereich der Zone II + III im wesentlichen der Verbindung II (s. Abb. 1, Seite 25).

Die Radioaktivität der Zone IV betrug bei den Kontrolltieren im Mittel 30 %. Nach 13tägiger Behandlung mit der Steroidsuspension A war das Metabolitenspektrum im Harn quantitativ eindeutig gegenüber dem der unbehandelten Kontrollen verändert. Der prozentuale Anteil der Zone I nahm zugunsten der Zone II + III und der Zone IV ab und betrug nach 21tägiger Behandlung nur noch ca. 10 %.

Wie Tab. VI zeigt, war die Veränderung des Metabolitenspektrums im Harn nach oraler Tryptophan-Verabreichung unter dem Einfluß der Steroidsuspension A auch bei Verwendung von weiblichen Ratten, Stamm Wistar (Fa. Spiegel), nachweisbar (Tab. VI, s. Seite 28).

Bei diesen Tieren entsprachen im Kontrollversuch im Mittel 56 % der radioaktiven Verbindungen im Harn der Zone I, 24 % den Zonen II + III und 20 % der Zone IV. Auch hier führte die Steroidbehandlung nach 13 Tagen zu einer deutlichen Abnahme der Zone I (Chinolinsäure) zugunsten der übrigen Zonen.

Behandlungs- dauer in Tagen	Anzahl der Tiere	Verteilung der Radioaktivität im Harn in %					
		Kontrolle			Steroid-behandelt		
		Zone I	Zone II+III	Zone IV	Zone I	Zone II+III	Zone IV
7	1	33	42	25	37	32	31
9	1	44	25	31	38	37	25
13	1	45	25	30	21	41	38
15	1	49	27	24	19	38	43
19	1	48	24	28	17	40	43
21	1	43	14	43	7	50	43

Tab. V: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Rattenharn nach oraler Verabreichung von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 μ C [14 C]-DL-Tryptophan.
Vorbehandlung: 0,06 mg Ae + 5 mg NET-Ac pro 100 g KG pro Tag
Tiermaterial: Weibl. Sprague-Dawley-Ratten, Fa. Dr. Hagemann

Behandlungs- dauer in Tagen	Anzahl der Tiere	Verteilung der Radioaktivität im Harn in %						
		Kontrolle				steroid-behandelt		
		Zone I	Zone II+III	Zone IV		Zone I	Zone II+III	Zone IV
7	1	66	17	17		48	30	22
13	1	46	29	25		21	49	30
14	1	53	28	19		16	47	37
17	1	+	-	-		13	54	33
19	1	58	22	20		19	53	28

* gestorben

Tab. VI: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Rattenharn nach oraler Verabreichung von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 μ C [14 C]-DL-Tryptophan.
Vorbehandlung: 0,06 mg Ae + 5 mg NET-Ac pro 100 g KG pro Tag
Tiermaterial: Weibliche Wistar-Ratten, Fa. Spiegel

Die Abb. 2 und 3 zeigen als Beispiel die Scannerdiagramme nach papierchromatographischer Differenzierung der radioaktiven Verbindungen im Harn von 13 (Abb. 2) bzw. 21 Tage (Abb. 3) mit Steroidsuspension A behandelten weiblichen Ratten (s. Tab. V, Seite 27).

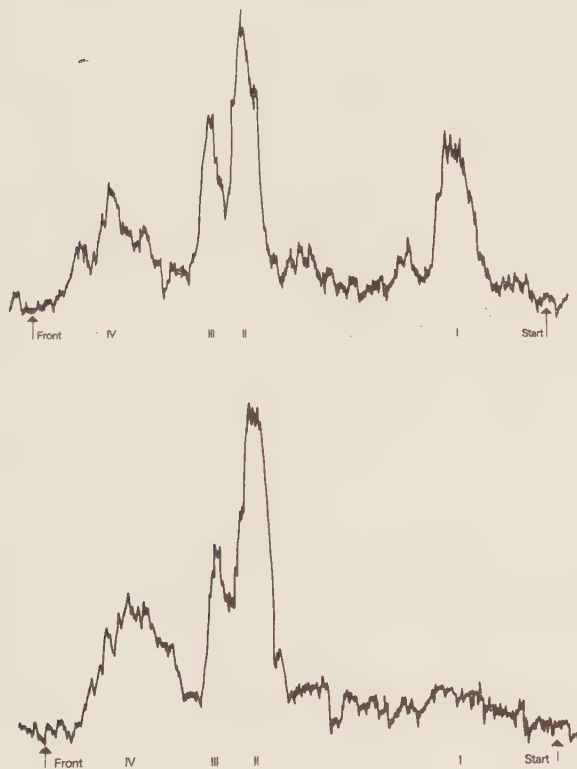


Abb. 2 und 3: ^{14}C -Tryptophan-Metabolitenspektrum im Harn weiblicher Ratten nach 13 (Abb. 2) bzw. 21tägiger (Abb. 3) oraler Behandlung mit Steroidsuspension A.

3.1.2 Einfluß der Kombination Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat in hoher Dosierung auf das Tryptophan-Metabolitenspektrum im Harn weiblicher Ratten nach einer Tryptophan-Tracerdosís

In den bisherigen Versuchen erhielten die Tiere hohe Dosen Tryptophan, in Anlehnung an den Tryptophan-Belastungstest beim Menschen. Wie in der Einleitung beschrieben, ermöglicht die hohe Tryptophan-Dosis beim Menschen eine Erfassung latenter Störungen des Tryptophan-Abbaus. Im Vergleich zu den mit einer sehr hohen Tryptophan-Dosis belasteten Kontrolltieren in den bisherigen Versuchen zeigte sich nach Verabreichung einer Tracerdosís von [^{14}C]-DL-Tryptophan bei den Kontrolltieren ein quantitativ stark verändertes ^{14}C -Tryptophan-Metabolitenspektrum im Harn (Abb. 4).

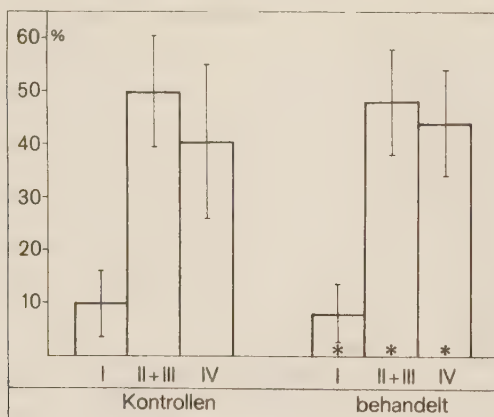


Abb. 4: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Rattenharn nach oraler Verabreichung von 5 μC

[^{14}C]-DL-Tryptophan ($\pm 19,6 \mu\text{g}$)

Vorbehandlung: 14 Tage 0,06 mg Ae + 5 mg NET-Ac/100 g KG, p.o.

* nicht signifikant verschieden gegen Kontrollwerte

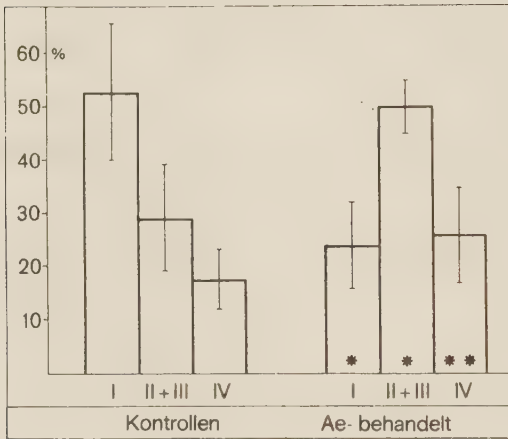
Nach Abb. 4 entfielen nach oraler Applikation einer Tracer-dosis von [^{14}C]-DL-Tryptophan nur ca. 10 % der Gesamtradioaktivität im Harn auf Chinolinsäure (Zone I). Durch eine 14tägige Behandlung mit der hochdosierten Östrogen-Gestagen-Kombination war nach Abb. 4 das Metabolitenspektrum im Harn gegenüber den Kontrollen nicht verändert, wenn nur eine Tracer-dosis ^{14}C -Tryptophan verabreicht wurde.

3.2 Einfluß der Steroid-Einzelkomponenten in hoher Dosierung

Nach den bisher geschilderten Ergebnissen wurde die Ausscheidung der radioaktiven Zone I (Chinolinsäure) im Tryptophan-Belastungstest bei der Ratte unter dem Einfluß der verwendeten Östrogen-Gestagen-Kombination stark vermindert. Diese Befunde erlauben keine Aussage zu der Frage, welche der beiden Steroidkomponenten für diesen Effekt verantwortlich ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Gruppen von je 8 Tieren 14 Tage mit Äthinylöstradiol bzw. Norethisteronacetat p.o. behandelt. Am letzten Behandlungstag erfolgte der Tryptophan-Belastungstest.

Die Abb. 5 und 6 zeigen die prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Rattenharn auf die Zonen I, II + III und IV nach der Östrogen- bzw. Gestagen-Verabreichung.

3.2.1 Einfluß von Äthinylöstradiol

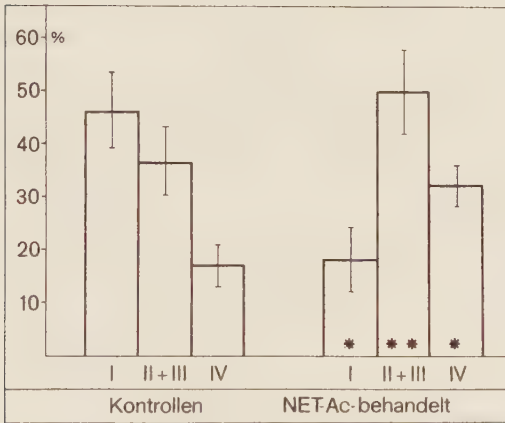


* = $p < 0,001$
** = $0,025 > p > 0,02$ } gegen Kontrollwerte

Abb. 5: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Rattenharn nach oraler Verabreichung von 30 mg

L-Tryptophan/100 g KG + 5 μ C [14 C]-DL-Tryptophan ($\hat{=}$ 19,6 μ g)
Vorbehandlung: 14 Tage 0,06 mg Äthinylöstradiol
p.o./100 g KG (n = 8)

3.2.2 Einfluß von Norethisteronacetat



* = $p < 0,001$
 ** = $0,005 > p > 0,001$ } gegen Kontrollwerte

Abb. 6: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Rattenharn nach oraler Verabreichung von 30 mg

L-Tryptophan/100 g KG + 5 μ C [14 C]-DL-Tryptophan ($\pm$ 19,6 μ g).

Vorbehandlung: 14 Tage 5 mg Norethisteronacetat p.o./100 g KG (n = 8)

3.3. Einfluß der Kombination Äthinylöstradiol- Norethisteronacetat in niedriger Dosierung

Bei den bisher beschriebenen Versuchen zur Beeinflussung des Tryptophan-Stoffwechsels durch eine Östrogen-Gestagen-Behandlung wurden sehr hohe Steroid-Dosen angewendet. Um eine gewisse Beziehung zu den beim Menschen erhobenen Befunden zu erhalten, wurden die Versuche mit einer niedrigen Steroid-Dosierung wiederholt. Bei gleicher Versuchsanordnung erhielten die weiblichen Ratten 14 bzw. 21 Tage oral 0,0125 mg Ae + 1 mg NET-Ac/100 g KG.

Die Ergebnisse der Harnanalytik nach einer ^{14}C -Tryptophan-Belastung sind in Tab. VII zusammengefaßt.

Behandlungs- dauer in Tag.	Tier Nr.	Verteilung der Radioaktivität im Harn in %					
		Kontrollen			Steroid-behandelt		
		Zone I	Zone II+III	Zone IV	Zone I	Zone II+III	Zone IV
14	1	49	34	17	15	65	22
	2	40	39	21	17	55	28
	3	51	33	15	15	60	25
	4	36	49	17	14	54	32
	5	53	33	9	24	55	21
	6	49	35	17	-	-	-
21	1	37	45	18	9	67	25
	2	45	37	18	12	69	20
	3	44	36	18	13	62	25
	4	55	34	12	16	52	31
	5	38	41	21	17	53	30
	6	48	34	18	-	-	-

- : nicht gemessen

Tab. VII: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Rattenharn nach oraler Verabreichung von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 μC [^{14}C]-DL-Tryptophan.
Vorbehandlung: 0,0125 mg Ae + 1 mg NET-Ac pro
100 g KG pro Tag

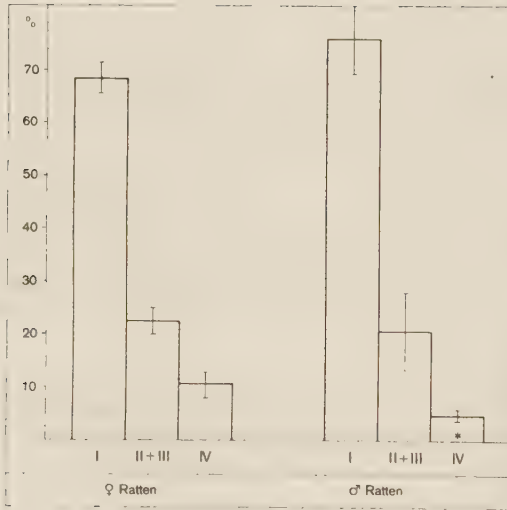
Nach Tab. VII führte auch die niedrige Östrogen-Gestagen-Dosierung bereits nach 14 Tagen zu den typischen Veränderungen des Tryptophan-Metabolitenspektrums im Harn, d. h. zu einer starken Verminderung der Zone I (Chinolinsäure) zugunsten der Zonen II + III und IV.

3.4 ^{14}C -Tryptophan-Stoffwechsel bei männlichen, weiblichen und ovariectomierten Ratten

Die vorstehend beschriebenen Veränderungen des Tryptophan-Stoffwechsels der Ratte unter dem Einfluß einer Östrogen-Gestagen-Kombination legte die Frage nahe, ob auch die unterschiedlichen Spiegel der endogenen Sexualhormone bei männlichen und weiblichen Ratten einen Unterschied im Tryptophan-Stoffwechsel bewirken können.

Neben dem Vergleich der ^{14}C -Eliminationsraten männlicher und weiblicher Tiere wurde die ^{14}C -Ausscheidung bei ovariectomierten Ratten mit denen von intakten Ratten verglichen.

Die folgenden Abb. 7 und 8 zeigen das quantitative Verteilungsmuster der ^{14}C -Tryptophan-Metabolite im 24-Stunden-Sammelharn der einzelnen Untersuchungsgruppen.



* = $0,01 > p > 0,005$

Abb. 7: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Harn männlicher und weiblicher Ratten nach oraler Verabreichung von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 μ C [14 C]-DL-Tryptophan ($\hat{=}$ 19,6 μ g) (n = 4)

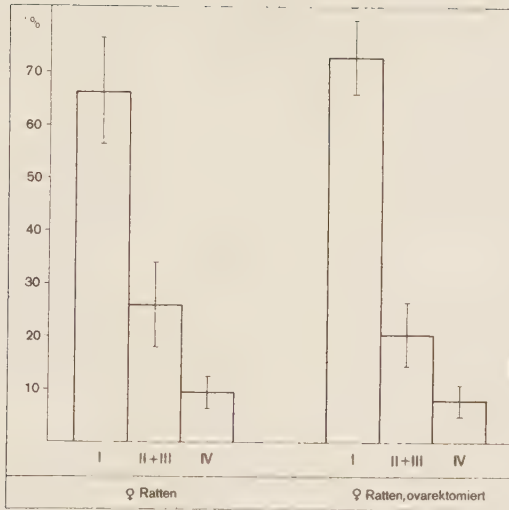


Abb. 8: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Harn weiblicher und ovariectomierter Ratten nach oraler Verabreichung von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 μ C [14 C]-DL-Tryptophan ($\approx$ 19,6 μ g)
Ovariectomie 5 Tage vor Versuchsbeginn (n = 4)

Nach Abb. 7 führt die normale endogene hormonelle Situation der weiblichen Ratte nach einer ^{14}C -Tryptophan-Belastung nicht zu einer signifikant verminderten Ausscheidung an ^{14}C -Chinolinsäure (Zone I) im Harn im Vergleich zu den an der männlichen Ratte erhaltenen Ergebnissen. Nur die Zone IV ist im Harn der männlichen Ratte quantitativ vermindert. Auch eine Ovariectomie (Abb. 8) führt zu keiner signifikanten Veränderung des ^{14}C -Tryptophan-Metabolitenspektrums im ^{14}C -Tryptophan-Belastungstest.

3.5 Einfluß der Gravidität auf den ^{14}C -Tryptophan-Stoffwechsel der Ratte

In einigen Versuchen sollte geprüft werden, ob auch eine vermehrte Produktion endogener Östrogene und Gestagene, wie sie in der Gravidität gegeben ist, zu den bei exogener Zufuhr der kontrazeptiven Steroide beobachteten Veränderungen im Tryptophan-Stoffwechsel führt.

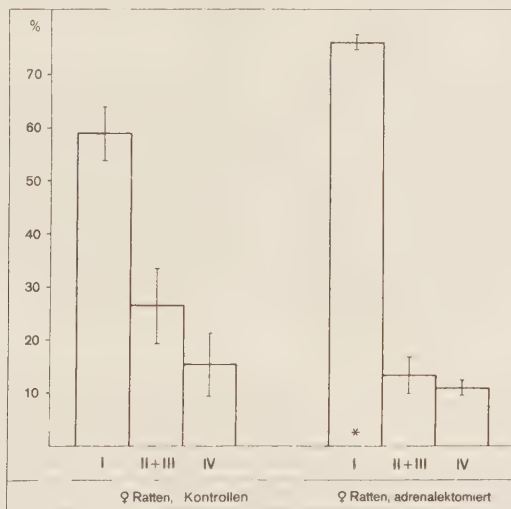
Nach Tab. VIII ist bei der 16 bzw. 17 Tage graviden Ratte das ^{14}C -Tryptophan-Metabolitenspektrum im Harn im ^{14}C -Tryptophan-Belastungstest gegenüber nicht graviden Tieren unverändert.

verteilung der Radioaktivität im Harn in %					
Kontrollen (n = 3)			gravid (n = 3)		
Zone I	Zone II+III	Zone IV	Zone I	Zone II+III	Zone IV
64	31	14	53	36	11
50	30	20	54	34	12
39	33	23	42	42	17

Tab. VIII: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Harn graver bzw. nicht graver Ratten nach oraler Verabreichung von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 μC [^{14}C]-DL-Tryptophan

3.6 ^{14}C -Tryptophan-Stoffwechsel bei intakten, adrenalectomierten und Kortikoid-substituierten weiblichen Ratten

Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, daß eine Östrogen-Behandlung zu einer Stimulation der Funktion der Nebennierenrinde und zu einer entsprechenden systemischen Kortikoidwirkung führt. Es lag daher nahe, die beobachteten Veränderungen des Tryptophan-Stoffwechsels der mit Äthinylöstrodiol und/oder Norethisteronacetat behandelten Ratte über eine Beeinflussung der Funktion der Nebennierenrinde zu erklären. Es wurde daher der Einfluß einer Adrenalectomie auf den Tryptophan-Stoffwechsel der Ratte untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 und 10 zusammengefaßt.



* $0,005 > p > 0,001$ (gegen Kontrollwerte)

Abb. 9: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Harn adrenalectomierter weiblicher Ratten nach oraler Verabreichung von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 μC

^{14}C -DL-Tryptophan ($\hat{=}$ 19,6 μg)

Vorbehandlung: Kontrollgruppe (Scheinoperation)

Versuchsgruppe (Adrenalectomie)

Versuchsausführung am 7. postop. Tag, (n = 4)

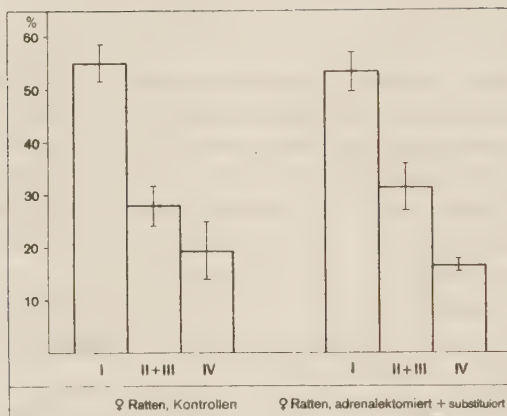


Abb. 10: Prozentuale Verteilung im Harn adrenaletomierter, Kortikoid-substituierter weiblicher Ratten nach oraler Verabreichung von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 μ C [14 C]-DL-Tryptophan (Δ 19,6 μ g).

Vorbehandlung: Kontrollgruppe (Scheinoperation)
Versuchsgruppe (Adrenaletomie) und Substitution mit 50 μ g Fluocortolon® pro 100 g KG pro Tag,
Substitution ab 2. postop. Tag,
Versuchsausführung am 7. postop. Tag

Aus Abb. 9 folgt, daß bei adrenaletomierten weiblichen Ratten im 14 C-Tryptophan-Belastungstest prozentual signifikant mehr 14 C-Chinolinsäure (Zone I) im Harn ausgeschieden wird als bei scheineroperierten Kontrolltieren. Die Zone II + III ist demgegenüber bei den adrenaletomierten Ratten geringfügig vermindert, die Zone IV im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht verändert.

Aus Abb. 10 folgt, daß eine Substitution mit dem synthetischen Kortikoid Fluocortolon® die in Abbildung 9 gezeigte Veränderung des quantitativen 14 C-Tryptophan-Metabolitenspektrums im Harn adrenaletomierter weiblicher Ratten wieder aufhebt.

3.7 Einfluß von L-Penicillamin auf den ^{14}C -Tryptophan-Stoffwechsel der weiblichen Ratten, allein und in Kombination mit Vitamin B_6

Vitamin B_6 hebt, wie in der Einleitung beschrieben, beim Menschen die unter dem Einfluß von oralen Kontrazeptiva auftretenden Veränderungen im Tryptophan-Metabolitenspektrum des Harns weitgehend auf. Es lag nahe, die vorstehend beschriebenen Veränderungen des Tryptophan-Stoffwechsels der Ratte auf einen durch die Östrogen-Gestagen-Kombination bedingten latenten Vitamin- B_6 -Mangel zurückzuführen. Es wurde daher untersucht, ob die Veränderungen im Tryptophan-Metabolitenspektrum des Rattenharns auch unter dem Einfluß des Vitamin- B_6 -Inhibitors L-Penicillamin auftreten.

Nach Tab. IX (Seite 42) führte L-Penicillamin bei der Ratte bereits nach 3tägiger intraperitonealer Verabreichung wie die Östrogen-Gestagen-Kombination zu einer Verminderung der Zone I (Chinolinsäure). Durch gleichzeitige subcutane Applikation von 2 mg Pyridoxin wurde diese Penicillamin-bedingte Veränderung aufgehoben.

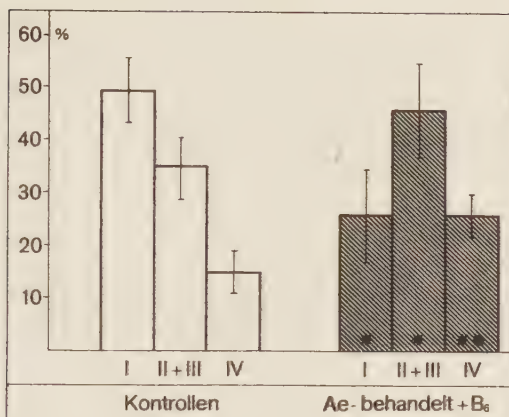
3.8 Einfluß von Vitamin B₆ auf das ¹⁴C-Tryptophan-Metabolitenspektrum im Harn weiblicher Ratten unter dem Einfluß von Äthinylöstradiol und/oder Norethisteronacetat

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit L-Penicillamin waren die durch die Östrogen-Gestagen-Kombination bedingten Veränderungen des ¹⁴C-Tryptophan-Metabolitenspektrums im Ratteuharn selbst durch die Gabe von 20 mg Pyridoxin pro Tag nicht aufhebbar. Die Östrogen-Gestagen-Kombination wurde in hoher Dosierung 7 bzw. 14 Tage lang allein und in Kombination mit Pyridoxin verabreicht. Die Ergebnisse sind in Tab. X auf Seite 44 zusammengefaßt.

Nach Abb. 5 und 6 auf Seite 32 und 33 dieser Arbeit führte sowohl Äthinylöstradiol als auch Norethisteronacetat im Harn zu einer signifikanten Abnahme des prozentualen Anteils der Chinolinsäure-Ausscheidung (Zone I) im Tryptophan-Be-lastungstest. Die Einzelkomponenten bewirkten qualitativ die gleiche Veränderung des Tryptophan-Metabolitenspektrums wie die Steroid-Kombination. Wie bei der Kombinationsbehandlung war die Änderung des Metabolitenspektrums im Harn auch bei den Einzelkomponenten durch gleichzeitig tägliche subcutane Verabreichung von 20 mg Pyridoxin nicht aufzuheben (Abb. 11 und 12, S. 45).

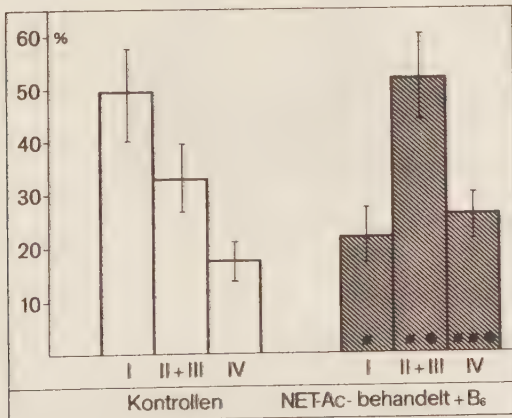
Behandlungsdauer in Tagen	Tier Nr.	Verteilung der Radioaktivität im Harn in %											
		Kontrollen				Steroid-behandelt				Steroid- + Pyridoxin-behandelt			
		Zone I	Zone II+III	Zone IV	Zone I	Zone II+III	Zone IV	Zone I	Zone II+III	Zone IV	Zone I	Zone II+III	Zone IV
7	1				25	47	28	44	34	22			
	2				46	32	22	31	47	22			
	3				50	35	15	43	37	20			
	4				44	37	19						
14	1	59	26	15	19	57	24	16	55	29	49	33	18
	2	50	29	21	11	64	25	29	41	30	50	34	16
	3	42	40	18	16	64	20	19	60	21	53	36	11
	4				33	43	24	12	62	26			
	5				13	58	29	18	58	24			
	6				14	57	29						
	7				8	60	32						
	8				28	50	22						

Tab. X: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Rattenharn nach oraler Verabreichung von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 μ C [14 C]-DL-Tryptophan. Vorbehandlung: 0,06 mg Ae + 5 mg NET-Ac/100 g KG/Tag allein sowie zusammen mit 20 mg Pyridoxin/100 g KG s.c.



* = $p < 0,001$
 ** = $0,005 > p > 0,001$ } gegen Kontrollwerte

Abb. 11: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Rattenharn nach oraler Verabreichung von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 μ C [14 C]-DL-Tryptophan ($\hat{=}$ 19,6 μ g).
 Vorbehandlung: 14 Tage 0,06 mg Ae p.o./100 g KG + 20 mg Pyridoxin s.c. (n = 8)

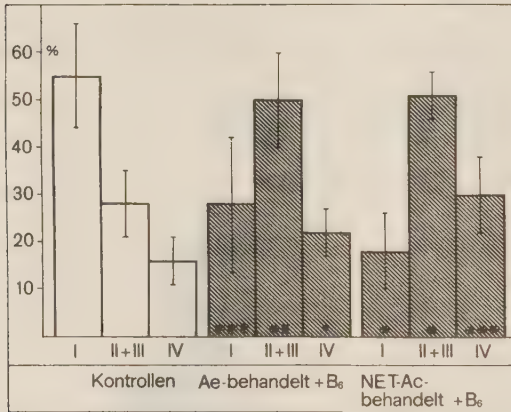


* = $p < 0,001$
 ** = $0,05 > p > 0,025$
 *** = $0,005 > p > 0,001$ } gegen Kontrollwerte

Abb. 12: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Rattenharn nach oraler Verabreichung von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 μ C [14 C]-DL-Tryptophan ($\hat{=}$ 19,6 μ g).
 Vorbehandlung: 14 Tage 5 mg NET-Ac p.o./100 g KG + 20 mg Pyridoxin s.c. (n = 8)

Nach Tab. VII Seite 34 dieser Arbeit führte die kombinierte Verabreichung von Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat auch bei niedriger Dosierung zu einer Abnahme der Chinolinsäure-Ausscheidung im Harn der mit Tryptophan belasteten Ratten.

Auch bei Verabreichung der Einzelkomponenten in niedriger Dosierung konnte die Erniedrigung der Chinolinsäure-Ausscheidung (Zone I) im Tryptophan-Belastungstest durch gleichzeitige tägliche Gabe von 20 mg Pyridoxin nicht aufgehoben werden (Abb. 13).



* = $p < 0,001$
** = $0,01 > p > 0,005$
*** = $0,02 > p > 0,01$
● = $0,2 > p > 0,1$

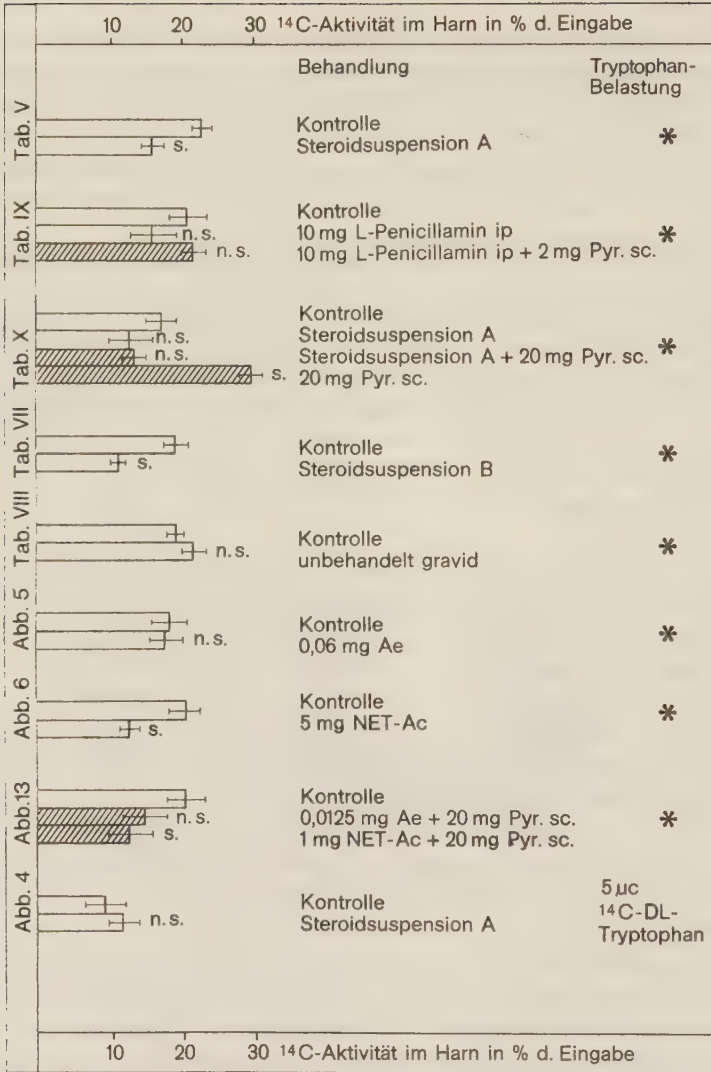
} gegen Kontrollwerte

Abb. 13: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Rattenharn nach oraler Verabreichung von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 µC [¹⁴C]-DL-Tryptophan ($\hat{=}$ 19,6 µg).
Vorbehandlung: 14 Tage 0,0125 mg Ae p.o./100 g KG + 20 mg Pyridoxin s.c. (n = 6) bzw.
1 mg NET-Ac p.o./100 g KG + 20 mg Pyridoxin s.c. (n = 6)

3.9 ^{14}C -Gesamtausscheidung im Harn nach oraler Verabreichung von ^{14}C -Tryptophan bei intakten und graviden weiblichen Ratten; unter dem Einfluß von L-Penicillamin allein und kombiniert mit Vitamin B_6 ; unter dem Einfluß von Äthinyl-östradiol und Norethisteronacetat, kombiniert in hoher und niedriger Dosierung bzw. als Einzelkomponenten, sowie in Kombination der Steroide mit Vitamin B_6

Bei den bisher beschriebenen Versuchen wurde jeweils die ^{14}C -Gesamtausscheidung im Harn über 24 Stunden nach der [^{14}C]-DL-Tryptophan-Verabreichung bestimmt. In Tabelle XI auf Seite 48 ist die ^{14}C -Ausscheidung im Harn in Prozent der Eingabe bei den verschiedenen Versuchen dargestellt. Die Einzelversuche sind bei der jeweils angegebenen Abbildung bzw. Tabelle beschrieben.

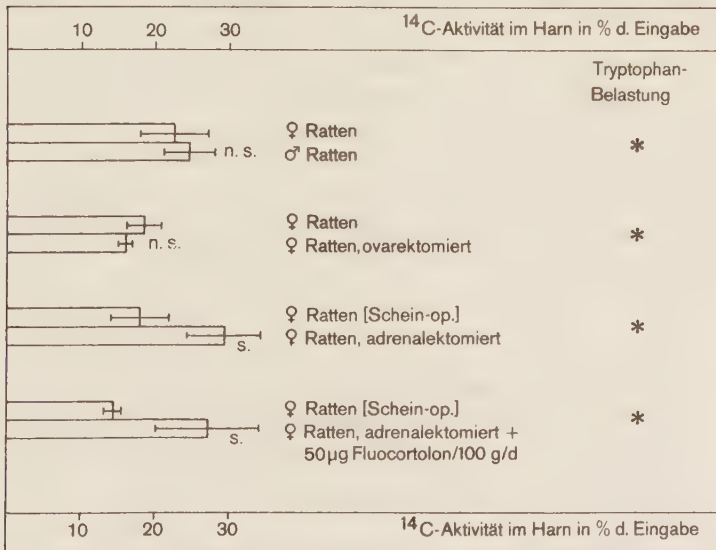
Von den nicht Steroid-behandelten Kontrolltieren wurden nach oraler Belastung mit 30 mg L-Tryptophan und 5 μC [^{14}C]-DL-Tryptophan ($\hat{=}$ 19,6 μg) in den verschiedenen Versuchen in 24 Stunden im Mittel 20 % der verabreichten Radioaktivität mit dem Harn eliminiert. Eine mehrtägige Vorbehandlung der Tiere mit 0,06 mg Ae + 5 mg NET-Ac bzw. 0,0125 mg Ae + 1 mg NET-Ac/100 g KG p.o. führte zu einer deutlichen Verminderung der ^{14}C -Elimination mit dem Harn (s. dazu auch Tab. V S. 27 und Tab. VII S. 34). Die herabgesetzte ^{14}C -Ausscheidung nach kombinierter Östrogen-Gestagen-Verabreichung ist offensichtlich nicht durch die Östrogenkomponente Ae, sondern durch das Gestagen NET-Ac bedingt (s. Versuch Abb. 5 und 6). Eine mehrtägige Verabreichung von 20 mg Pyridoxin führte bei nicht Steroid-behandelten Tieren im Tryptophan-Belastungstest zu einer starken Erhöhung der ^{14}C -Ausscheidung im Harn auf ca. 30 % der Eingabe in 24 Stunden (s. dazu auch Tab. X S. 44). Das bedeutet, daß es beim Belastungstest für den Abbau des Tryptophans zu harngängigen Metaboliten zu einem relativen Pyridoxalphosphat-Mangel kommt.



Tab. XI: ^{14}C -Ausscheidung im Harn weiblicher Ratten bis 24 Stunden nach oraler Verabreichung von $5\text{ }\mu\text{C}$ [^{14}C]-DL-Tryptophan ($\hat{=}$ $19,6\text{ }\mu\text{g}$) allein bzw. in Kombination mit 30 mg L-Tryptophan/ 100 g KG .
 Steroidsuspension A: p.o. $0,06\text{ mg Ae} + 5\text{ mg NET-Ac}/100\text{ g KG}$
 Steroidsuspension B: p.o. $0,0125\text{ mg Ae} + 1\text{ mg NET-Ac}/100\text{ g KG}$
 s. : signifikant verschieden von Kontrolle ($p < 0,02$)
 n.s.: nicht signifikant verschieden von Kontrolle
 Pyr.: Pyridoxin
 * : 30 mg L-Tryptophan/ $100\text{ g KG} + 5\text{ }\mu\text{C}$ [^{14}C]-DL-Tryptophan

3.10 ^{14}C -Gesamtausscheidung im Harn nach oraler Verabreichung von ^{14}C -Tryptophan bei intakten und ovariectomierten weiblichen Ratten, intakten weiblichen und männlichen Ratten, intakten und adrenalectomierten weiblichen Ratten und Kortikoid-substituierten weiblichen Ratten

Analog zu den vorausgegangenen Versuchsreihen wurde auch bei den Untersuchungen zu den Punkten 3.4 (s.S. 35 ff.) und 3.6 (s.S. 39 ff.) dieser Arbeit die Gesamt- ^{14}C -Ausscheidung im 24-Stunden-Sammelharn gemessen. Die Tabelle XII gibt die ^{14}C -Ausscheidung im Harn in Prozent der Eingabe wieder.



Tab. XII: ^{14}C -Gesamtausscheidung im Harn männlicher und weiblicher Ratten bis 24 Stunden nach oraler Verabreichung von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 µC [^{14}C]-DL-Tryptophan ($\approx 19,6$ µg).
 s. : signifikant verschieden von Kontrollen ($p < 0,02$)
 n.s.: nicht signifikant verschieden von Kontrollen

Aus Tab. XII folgt, daß im ^{14}C -Tryptophan-Belastungstest die ^{14}C -Gesamtausscheidung im 24-Stunden-Sammelharn bei männlichen und weiblichen Ratten gleich ist, und daß auch eine Ovariectomie die ^{14}C -Gesamtausscheidung nicht beeinflusst. Überraschenderweise wird aber durch die Adrenalectomie die ^{14}C -Elimination mit dem Harn im ^{14}C -Tryptophan-Belastungstest signifikant erhöht. Eine zusätzliche Substitution der adrenalectomierten weiblichen Ratten mit einem synthetischen Kortikoid führt nicht zu einer weiteren Steigerung der ^{14}C -Ausscheidung im Harn.

3.11 $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung nach oraler Verabreichung von
 ^{14}C -Tryptophan

Neben der Bestimmung der ^{14}C -markierten Tryptophan-Metabolite im Harn behandelter und unbehandelter Ratten wurde auch die $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung nach Gabe von $[\text{}^{14}\text{C}]$ -DL-Tryptophan allein oder in Kombination mit einer oralen Belastungsdosis von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG gemessen, um eine Aussage zum zeitlichen Verlauf und zur Beeinflussung der am Tryptophan-Stoffwechsel beteiligten Enzymsysteme machen zu können.

3.11.1 $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung nach oraler Verabreichung von
 ^{14}C -Tryptophan unter dem Einfluß der hochdosierten
Äthinylöstradiol-Norethisteronacetat-Kombination bei
einer hohen bzw. einer Tracerdosierung von ^{14}C -DL-
Tryptophan-----

Die Tiere wurden oral 14 Tage mit 0,06 mg Äthinylöstradiol und 5 mg Norethisteronacetat pro 100 g KG behandelt. Nach der letzten Verabreichung erhielten die Ratten oral 5 μC $[\text{}^{14}\text{C}]$ -DL-Tryptophan ($\approx 19,6 \mu\text{g}$) allein oder zusammen mit 30 mg L-Tryptophan/100 g KG. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Elimination wurde über insgesamt 9 Stunden gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 (s. S. 51) zusammengefaßt.

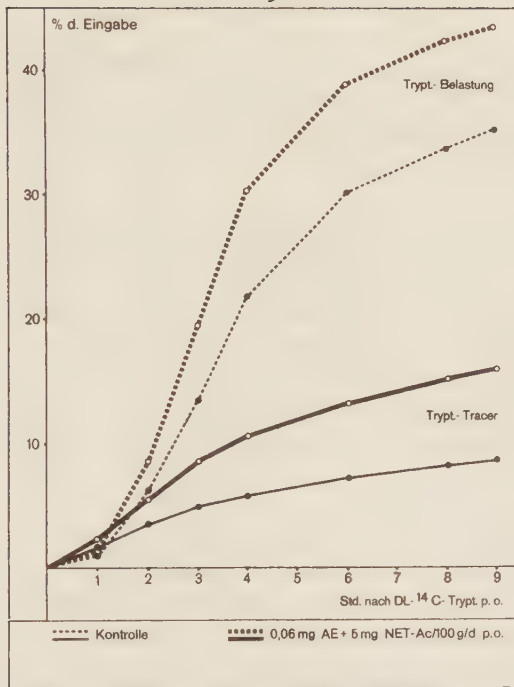


Abb. 14: $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung der Ratte in Prozent des oral verabreichten ^{14}C -DL-Tryptophan.

- : Kontrollen, $5 \mu\text{C}$ ^{14}C -DL-Tryptophan
- : Kontrollen, $5 \mu\text{C}$ ^{14}C -DL-Tryptophan + 30 mg L-Tryptophan/100 g KG
- : 14 Tage vorbehandelt mit 0,06 mg Ae + 5 mg NET-Ac; $5 \mu\text{C}$ ^{14}C -DL-Tryptophan
- : 14 Tage vorbehandelt mit 0,06 mg Ae + 5 mg NET Ac; $5 \mu\text{C}$ ^{14}C -DL-Tryptophan + 30 mg L-Tryptophan/100 g KG

Bei alleiniger oraler Verabreichung von $5 \mu\text{C}$ ^{14}C -DL-Tryptophan ($\hat{=}$ 19,6 μg) wurde durch die 14tägige Vorbehandlung mit Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat die $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung hochsignifikant verstärkt. Ein hochsignifikanter Anstieg der $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung nach Steroid-Vorbehandlung war auch im Tryptophan-Belastungstest nachweisbar.

3.11.2 $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung nach oraler Verabreichung von
 ^{14}C -Tryptophan unter dem Einfluß von L-Penicillamin,
Vitamin B_6 sowie unter deren Kombination

Die weiblichen Ratten wurden 3 Tage subcutan mit 20 mg Vitamin B_6 /Tag bzw. mit L-Penicillamin 10 mg/100 g KG/Tag i.p. bzw. mit 20 mg Vitamin B_6 s.c. + 10 mg L-Penicillamin pro 100 g KG/Tag i.p. behandelt. Nach der letzten Verabreichung erhielten die Tiere oral 5 μC [^{14}C]-DL-Tryptophan ($\approx 19,6 \mu\text{g}$) zusammen mit L-Tryptophan 30 mg/100 g KG. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Elimination mit der Atemluft wurde über insgesamt 9 Stunden gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 zusammengefaßt.

Wie Abb. 15 zeigt, hemmt die Vorbehandlung mit L-Penicillamin die $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung im Tryptophan-Belastungstest sehr stark im Vergleich zu den an unbehandelten Ratten erhaltenen Ergebnissen. Die gleichzeitige Vitamin- B_6 -Verabreichung hebt die durch L-Penicillamin bedingte Verminderung der $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung wieder auf. Eine alleinige Behandlung der Tiere mit Vitamin B_6 steigert die $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung über die der Kontrolltiere hinaus.

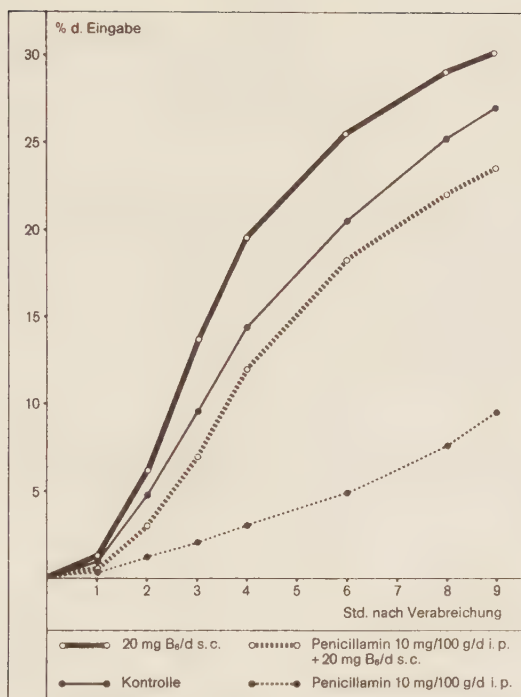


Abb. 15: $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung der Ratte in Prozent des verabreichten ^{14}C -DL-Tryptophans

- : Kontrollen, $5 \mu\text{C}$ ^{14}C -DL-Tryptophan + 30 mg L-Tryptophan/100 g KG
- : 3 Tage vorbehandelt mit L-Penicillamin 10 mg/100 g KG/Tag; $5 \mu\text{C}$ ^{14}C -DL-Tryptophan + 30 mg L-Tryptophan/100 g KG
- : 3 Tage vorbehandelt mit 20 mg Vitamin B₆/Tag s.c.; $5 \mu\text{C}$ ^{14}C -DL-Tryptophan + 30 mg L-Tryptophan/100 g KG
- : 3 Tage vorbehandelt mit L-Penicillamin 10 mg/100 g KG/Tag i.p. + 20 mg Vitamin B₆/Tag s.c.; $5 \mu\text{C}$ ^{14}C -DL-Tryptophan + 30 mg L-Tryptophan/100 g KG

3.11.3 $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung nach oraler Verabreichung von
 ^{14}C -Tryptophan bei intakten und ovariectomierten
weiblichen und bei männlichen Ratten-----

Eine mögliche Beeinflussung des ^{14}C -Tryptophan-Stoffwechsels durch die unterschiedliche endogene Hormonproduktion bei männlichen und weiblichen Ratten sollte durch Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung nach oraler Verabreichung von $5\ \mu\text{C}$ [^{14}C]-DL-Tryptophan in Verbindung mit 30 mg L-Tryptophan pro 100 g KG untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 zusammengefaßt.

Wie aus Abb. 16 zu ersehen ist, kann kein signifikanter Einfluß der endogenen Geschlechtshormone auf die Metabolisierung des ^{14}C -Tryptophans zu $^{14}\text{CO}_2$ festgestellt werden.

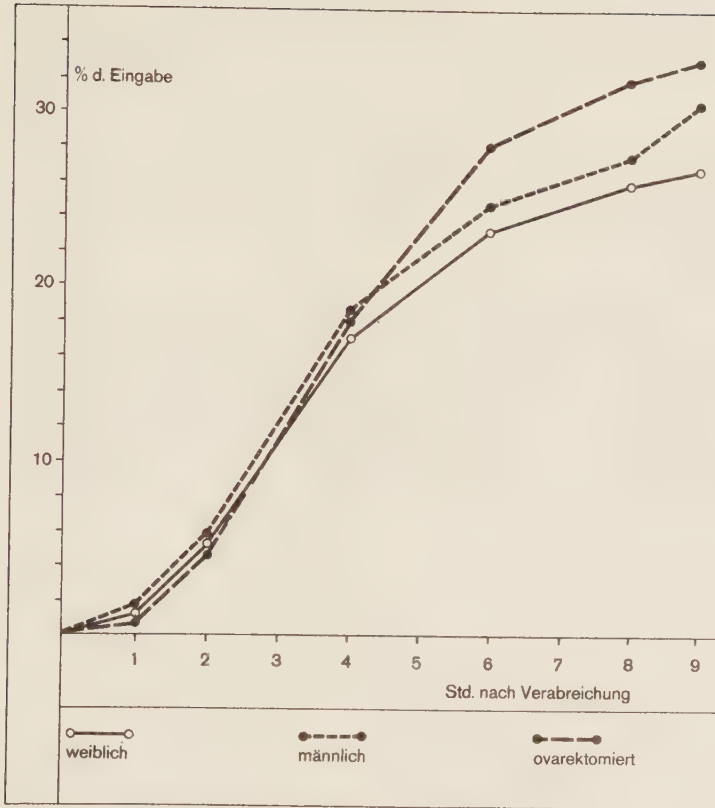


Abb. 16: $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung der Ratte in Prozent des verabreichten $[^{14}\text{C}]$ -DL-Tryptophans

●- - - ●	: männliche Ratten	$\left\{ \begin{array}{l} 5 \mu\text{C } [^{14}\text{C}] \text{-DL-Tryptophan} \\ (\hat{=} 19,6 \mu\text{g}) + 30 \text{ mg} \\ \text{L-Tryptophan pro } 100 \text{ g KG,} \\ \text{p.o.} \end{array} \right.$
○- - - ○	: weibliche Ratten	
●- · - · ●	: ovariectomierte Ratten	

(Ovariectomie: 5 Tage vor Versuchsbeginn)

3.11.4 $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung nach oraler Verabreichung von
 ^{14}C -Tryptophan bei intakten und adrenaletomierten
sowie bei Kortikoid-substituierten weiblichen Ratten

Analog zu den unter 3.6 und 3.10 beschriebenen Versuchen wurde die ^{14}C -Tryptophan-Metabolisierung zu $^{14}\text{CO}_2$ unter Einfluß der endogenen Glukokortikoid-Produktion bzw. nach Adrenaletomie und Substituierung mit Fluocortolon [®] gemessen.

Wie ein Vergleich der Ergebnisse in Abb. 17 (s. S. 57) zeigt, haben nicht Kortikoid-substituierte adrenaletomierte weibliche Ratten eine signifikant niedrigere Umwandlungsrate von ^{14}C -Tryptophan zu $^{14}\text{CO}_2$ als nicht adrenaletomierte Tiere. Eine Substitution mit 50 μg Fluocortolon [®]/Tag restituiert die Metabolisierung zu $^{14}\text{CO}_2$ auf normale Werte.

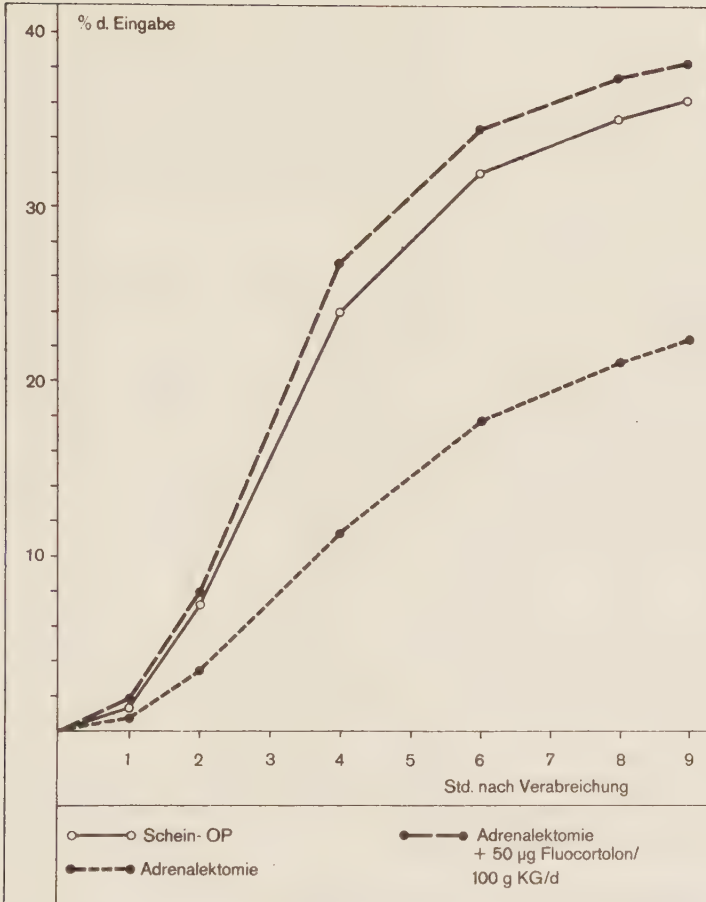


Abb. 17: $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung der Ratte in Prozent des oral verabreichten ^{14}C -DL-Tryptophans

- — ○ : Kontrollgruppe (Scheinoperation);
5 µC ^{14}C -DL-Tryptophan ($\approx 19,6$ µg)
+ 30 mg L-Tryptophan/100 g KG p.o.
- - - - ● : adrenalektomierte Ratten;
5 µC ^{14}C -DL-Tryptophan
+ 30 mg L-Tryptophan/100 g KG p.o.
- - · - · ● : adrenalektomierte Ratten, ab. 2. postop. Tag
Substitution mit 50 µg Fluocortolon pro
100 g KG/Tag; 5 µC ^{14}C -DL-Tryptophan
+ 30 mg L-Tryptophan/100 g KG p.o.

Versuchsausführung am 7. postop. Tag

3.12 Einfluß der Gestagene Progesteron, Chlormadinonacetat und D-Norgestrel auf den ^{14}C -Tryptophan-Stoffwechsel der weiblichen Ratte, gemessen an der ^{14}C -Metabolitenverteilung im Harn sowie an der ^{14}C -Gesamtelimination über den Harn

Wie bei 3.2.2 und 3.9 gezeigt werden konnte, ändert sich die Tryptophan-Metabolitenverteilung im Harn sowie die ^{14}C -Gesamtelimination über den Harn signifikant unter einer Behandlung mit Norethisteronacetat. Es wurde daher untersucht, ob andere Gestagene ähnliche Effekte auf den Tryptophan-Stoffwechsel der Ratte haben. Die Tab. XIII auf Seite 59 zeigt die prozentuale Verteilung der ^{14}C -Tryptophan-Metabolite im Harn weiblicher Ratten, die oral 5 μC [^{14}C]-DL-Tryptophan + 30 mg L-Tryptophan/100 g KG nach entsprechender Vorbehandlung mit den einzelnen Gestagenen erhalten hatten.

Wie aus Tab. XIII (s. S. 59) zu ersehen ist, hat die Applikation von Progesteron weder nach 8tägiger noch nach 14tägiger Vorbehandlung einen signifikanten Einfluß auf die Verteilung der Tryptophan-Metabolite im Rattenharn.

Eine 14tägige Vorbehandlung mit Chlormadinonacetat senkt die Ausscheidung der Chinolinsäure (Zone I) und steigert die Ausscheidung der Metabolite in Zone II + III sowie der Zone IV.

Die Vorbehandlung mit D-Norgestrel äußerte sich demgegenüber nach 14 Tagen in einer signifikanten Steigerung der Metabolitenausscheidung in Zone II + III.

Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Harn

Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Harn									
Vorbehandlung	Zone I			Zone II + III			Zone IV		
	Behandelt	Kontrollen	Signi- fikanz	Behandelt	Kontrollen	Signi- fikanz	Behandelt	Kontrollen	Signi- fikanz
Progesteron s.c., 2mg/ 100g KG, 8 Tg., (n=8)	45,7 $\pm$ 12,0	48,2 $\pm$ 10,2	n.s.	35,2 $\pm$ 7,7	35,2 $\pm$ 9,5	n.s.	21,1 $\pm$ 4,6	18,5 $\pm$ 4,0	n.s.
Progesteron s.c., 2mg/ 100g KG, 14 Tg., (n=8)	58,4 $\pm$ 15,4	40,3 $\pm$ 4,6	n.s.	47,6 $\pm$ 8,1	40,7 $\pm$ 4,2	n.s.	17,3 $\pm$ 3,6	19,1 $\pm$ 3,0	n.s.
Chlormadinon- acetat, p.o., 5 mg/100g KG, 14 Tg., (n=8)	40,3 $\pm$ 7,0	47,6 $\pm$ 4,3	*	40,1 $\pm$ 3,5	28,7 $\pm$ 4,0	*	19,6 $\pm$ 4,8	13,9 $\pm$ 1,4	**
D-Norgestrel s.c., 2mg/ 100g KG, 8 Tg., (n=8)	61,2 $\pm$ 10,9	55,5 $\pm$ 12,9	n.s.	29,5 $\pm$ 6,9	30,3 $\pm$ 8,3	n.s.	9,3 $\pm$ 4,2	14,1 $\pm$ 5,3	n.s.
D-Norgestrel s.c., 2 mg/ 100g KG, 14 Tg., (n=8)	41,9 $\pm$ 4,0	51,5 $\pm$ 10,0	n.s.	42,4 $\pm$ 4,7	50,8 $\pm$ 4,0	**	15,7 $\pm$ 2,4	18,0 $\pm$ 6,3	n.s.

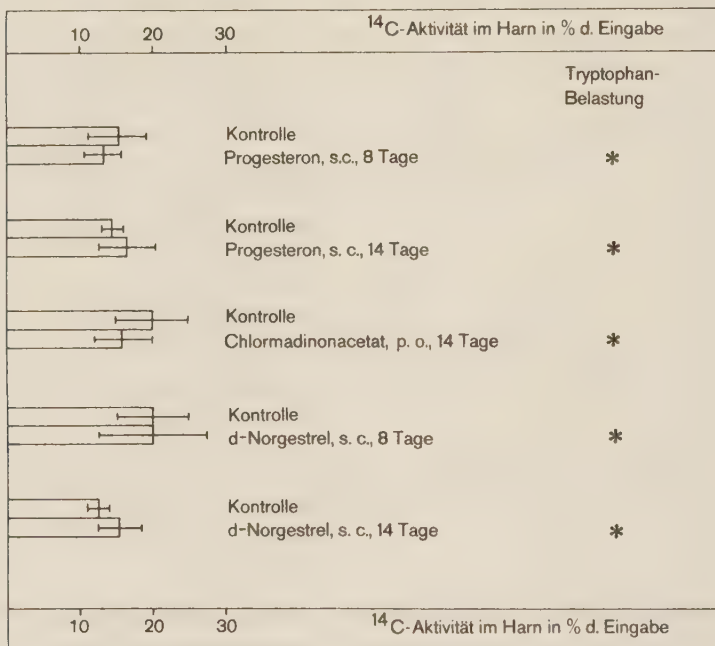
* Signifikanz: $p < 0.001$

** Signifikanz: $0.01 > p > 0.005$

n.s.: nicht signifikant

Tab. XIII: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Harn weiblicher Ratten nach oraler Verabreichung von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 μ C [14 C]-DL-Tryptophan

Neben der ^{14}C -Tryptophan-Metabolitenverteilung im Harn weiblicher Ratten nach Vorbehandlung mit Progesteron, Chlormadinonacetat bzw. D-Norgestrel wurde die ^{14}C -Gesamtelimination im 24-Stunden-Sammelharn ermittelt. Die folgende Tab. XIV zeigt die ^{14}C -Gesamtausscheidung der einzelnen Behandlungsgruppen nach oraler Verabreichung von 30 mg L-Tryptophan/100 g KG + 5 μC [^{14}C]-DL-Tryptophan ($\approx 19,6 \mu\text{g}$).



Tab. XIV: ^{14}C -Gesamtelimination im Harn weiblicher Ratten nach oraler Verabreichung von 5 μC [^{14}C]-DL-Tryptophan + 30 mg L-Tryptophan/100 g KG. Vorbehandlung: siehe Tab. XIII auf Seite 59

Wie aus der Tab. XIV auf Seite 60 zu ersehen ist, machte sich bei den hier verwendeten Gestagenen kein signifikanter Einfluß auf die ^{14}C -Gesamtelimination im 24-Stunden-Sammelharn nach Verabreichung einer oralen Tryptophan-Belastungsdosis von 30 mg L-Tryptophan mit 5 μC [^{14}C]-DL-Tryptophan ($\pm 19,6 \mu\text{g}$) bemerkbar.

3.13 $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung nach oraler Verabreichung von L-Leucin-[1- ^{14}C] bei weiblichen Ratten nach Behandlung mit Norethisteronacetat allein und in Kombination mit Vitamin B₆

In orientierenden Versuchen sollte untersucht werden, ob eine Behandlung mit Norethisteronacetat zu Veränderungen im Metabolismus des Leucins führt.

Die Aminosäure Leucin wurde gewählt, da das Enzymsystem, das für den Transaminierungsschritt von L-Leucin zu 2-Keto-Isokapronat verantwortlich ist, Pyridoxalphosphat als Koenzym benötigt und damit wahrscheinlich als weiteres Modell für den Einfluß von Vitaminsupplementationen auf hormonell bedingte Aktivitätsveränderungen Aminosäuren-metabolisierender Enzyme gelten dürfte.

In diesen Versuchen wurde nach einer 14tägigen Vorbehandlungszeit mit Norethisteronacetat allein bzw. in Kombination mit 20 mg Vitamin B₆/Tag den Ratten oral 5 μC L-Leucin-[1- ^{14}C] ($\pm 12,4 \mu\text{g}$) allein oder in Verbindung mit 19,2 mg L-Leucin (äquimolar zu 30 mg L-Tryptophan) verabreicht. Die Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung erfolgte über insgesamt 9 Stunden.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Abb. 18 und 19 zusammengefaßt.

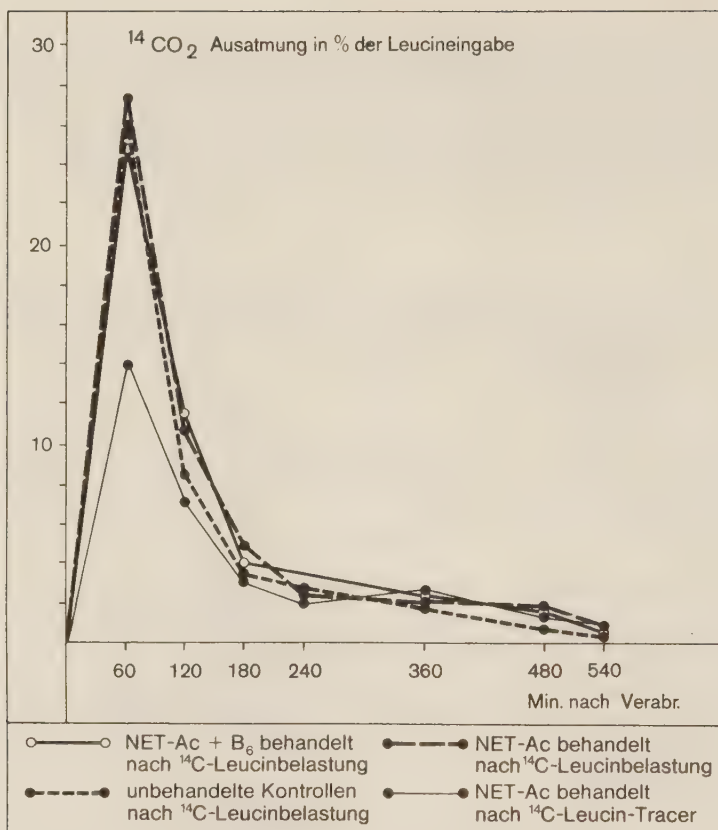


Abb. 18: $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung weiblicher Ratten in Prozent des oral verabreichten L-Leucin-[1- ^{14}C]

- : Kontrollen, unbehandelt
Leucin: Tracerdosierung (5 μC L-Leucin-[1- ^{14}C])
+ Belastungsdosis (19,2 mg L-Leucin)
- — ● : NET-Ac (5 mg/100 g KG, 14 Tage)
Leucin: Tracerdosierung
- : NET-Ac (5 mg/100 g KG, 14 Tage)
Leucin: Tracerdosierung + Belastungsdosis
- — ○ : NET-Ac (5 mg/100 g KG, 14 Tage)
+ 20 mg Pyridoxalphosphat p.o., 14 Tage
Leucin: Tracerdosierung + Belastungsdosis

Um die quantitativen Umsatzraten zu ermitteln, wurden die prozentualen Werte der $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung nach L-Leucin- $[1-^{14}\text{C}]$ -Gabe auf den molaren L-Leucin-Umsatz umgerechnet. Die Abb. 19 auf Seite 64 gibt in kumulativen Werten den Umsatz des insgesamt eingegebenen Leucins nach entsprechender Vorbehandlung wieder.

Wie aus den Abb. 18 und 19 zu entnehmen ist, hat weder die Vorbehandlung mit Norethisteronacetat noch die Gabe von Vitamin B_6 einen signifikanten Einfluß auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung nach Belastung mit 19,2 mg L-Leucin in Verbindung mit einer Tracerdosis von 12,4 μg L-Leucin- $[1-^{14}\text{C}]$ gezeigt. Vergleicht man jedoch die Werte des Leucin-Umsatzes unter Belastung mit denen bei alleiniger Tracergabe, so zeigt sich eine hochsignifikante Steigerung des Leucin-Umsatzes unter Leucin-Belastung.

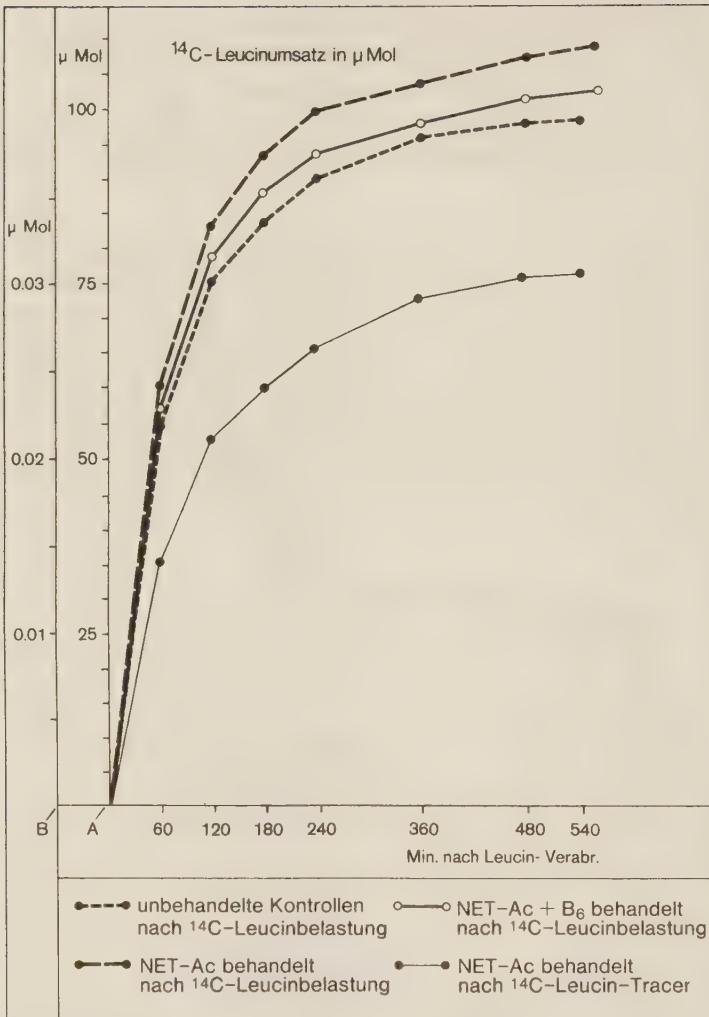


Abb. 19: Leucin-Umsatz der weiblichen Ratte in μMol nach Verabreichung von L-Leucin-[$1\text{-}^{14}\text{C}$] allein bzw. in Kombination mit 19,2 mg L-Leucin. Versuchsbeschreibung siehe Legende Abb. 18 auf Seite 62.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der Tryptophan-Stoffwechsel der Ratte unter verschiedenen endokrinen Bedingungen untersucht. Der Stoffwechsel der für den Menschen essentiellen Aminosäure Tryptophan besitzt eine gewisse Sonderstellung, da zahlreichen Metaboliten des Tryptophans eine wichtige physiologische und z. T. auch pathophysiologische Bedeutung zukommt. Es sei in diesem Zusammenhang nur hingewiesen auf die Bildung von NAD^+ bzw. NADP^+ , Tryptamin, Indoleessigsäure (Auxin) und Serotonin.

Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt wurde, sind mehrere Reaktionsschritte im Tryptophan-Abbauweg von der Anwesenheit des Vitamin B_6 als Koenzym abhängig. Weiterhin wurde gezeigt, daß bei alimentären bzw. medikamentös bedingten Vitamin- B_6 -Mangelzuständen der Tryptophan-Stoffwechsel an verschiedenen Stellen gehemmt wird und daß dies zu einem latenten oder manifesten Mangelzustand von biologisch wichtigen Tryptophan-Metaboliten führen kann.

In der Einleitung wurde ebenfalls auf verschiedene Arbeiten hingewiesen, die sich mit der Beeinflussung des Tryptophan-Stoffwechsels durch hormonelle Kontrazeptiva beschäftigen. Es wurde gezeigt, daß beim Menschen die Veränderungen im Tryptophan-Metabolitenspektrum im Harn unter dem Einfluß hormoneller Kontrazeptiva auf die darin enthaltene Östrogen-Komponente zurückzuführen ist.

Diese Veränderung des Tryptophan-Stoffwechsels beim Menschen unter dem Einfluß hormoneller Kontrazeptiva wird im Tryptophan-Belastungstest besonders deutlich, d. h. bei Bedingungen, unter denen eine unphysiologisch hohe Tryptophan-Dosis oral appliziert wird. Man geht davon aus, daß unter diesen Bedingungen bestimmte enzymatische Reaktionen im Tryptophan-Stoffwechsel

gleichsam mit Substrat 'übersättigt' werden. Diese Reaktionsschritte werden dann für den weiteren Abbau geschwindigkeitsbestimmend. An Verzweigungsstellen im Tryptophan-Abbauweg kann dies dann zu einer vermehrten Einschleusung in Stoffwechselschritte führen, die unter physiologischen Bedingungen eine quantitativ untergeordnete Rolle spielen.

Die Veränderungen des Tryptophan-Metabolitenspektrums im Harn des Menschen unter dem Einfluß hormoneller Kontrazeptiva werden auf einen durch die östrogene Komponente des Kontrazeptivums ausgelösten latenten Pyridoxalphosphat-Mangel zurückgeführt, der besonders im Tryptophan-Belastungstest manifest wird.

Bei den Untersuchungen über Veränderungen des Tryptophan-Metabolitenspektrums im Harn im Tryptophan-Belastungstest werden einige analytisch relativ leicht nachweisbare Tryptophan-Metabolite quantitativ bestimmt. Ein ganz wesentlicher Nachteil dieser Untersuchungen am Menschen liegt darin, daß aus den Veränderungen der nur in wenigen Prozent der verabreichten Tryptophan-Dosis im Harn auftretenden Metabolite Aussagen über den Gesamtabbau abgeleitet werden müssen, d. h. man erfaßt im Harn analytisch nur ca. 5 % der Tryptophan-Belastungsdosis und schließt auf das Stoffwechselverhalten der restlichen 95 %.

Da sich Untersuchungen am Menschen mit radioaktiv markiertem Tryptophan verbieten, wurde hier an der Ratte der Einfluß verschiedener endokriner Bedingungen auf den Stoffwechsel des radioaktiv markierten Tryptophans gemessen. Eine Schwierigkeit ergab sich dadurch, daß kein geeignet radioaktiv markiertes L-Tryptophan zur Verfügung stand. Wie aber bereits in der Einleitung ausgeführt wurde, wird bei der Ratte D-Tryptophan in gleicher Weise wie L-Tryptophan metabolisiert (63), so daß es möglich war, mit einem im Benzolring ^{14}C -markierten DL-Tryptophan zu arbeiten. Bei den Belastungstesten an der Ratte wurde das ^{14}C -DL-Tryptophan (ca. 20 µg)

mit einer großen Menge L-Tryptophan (30 mg/100 g KG) kombiniert oral verabreicht.

In einleitenden Untersuchungen wurde gezeigt, daß die Ratte im Tryptophan-Belastungstest als Hauptmetabolit Chinolinsäure über den Harn ausscheidet. Diese Verbindung wurde im Rahmen einer anderen Arbeit isoliert und mit chemischen und physikalischen Methoden identifiziert. Neben der Chinolinsäure wurden im Harn in geringerer Menge Kynurensäure, 3-OH-Kynurenin, Xanthurensäure und 3-OH-Anthranilsäure chromatographisch charakterisiert (unveröffentlichte Befunde).

Die Verabreichung des Östrogens Äthinylöstradiol zusammen mit dem Gestagen Norethisteronacetat führte bei der Ratte zu einer deutlichen Abnahme der Chinolinsäure-Ausscheidung im Tryptophan-Belastungstest. Bei nicht mit Steroiden behandelten Tieren entfielen von den insgesamt mit dem Harn ausgeschiedenen ¹⁴C-Tryptophan-Metaboliten etwa 40 - 50 % auf Chinolinsäure (Abb. 1 S. 25, Tab. V S. 27, Tab. VI S. 28). Die Steroidverabreichung führte zu einer mit der Behandlungszeit zunehmenden Verminderung der Chinolinsäure-Ausscheidung auf etwa 10 - 20 % der Gesamtradioaktivität im Harn nach ca. 20-tägiger Vorbehandlungszeit (Abb. 2 S. 29, 3 S. 29, Tab. V S. 27, VI S. 28).

Entsprechend der Abnahme der Chinolinsäure im Harn nahm die Ausscheidung anderer Metabolite, die sich chromatographisch im wesentlichen wie Kynurensäure, 3-OH-Kynurenin, Kynurenin, Xanthurensäure, 3-OH-Anthranilsäure und Anthranilsäure verhielten, zu.

In der vorliegenden Arbeit wurde in den Abbildungen die Chinolinsäure mit I, das Gemisch der Metabolite Kynurensäure, Xanthurensäure, Kynurenin und 3-OH-Kynurenin mit II + III bezeichnet und die sich chromatographisch wie 3-OH-Anthranilsäure und Anthranilsäure verhaltenden Verbindungen mit IV.

Bei der Verabreichung der einzelnen Steroid-Komponenten zeigte sich, daß die beschriebenen charakteristischen Veränderungen des Metabolitenspektrums im Harn im Tryptophan-Belastungstest auch dann auftreten, wenn die Östrogen- bzw. Gestagen-Komponenten getrennt verabreicht werden (Abb. 5 S. 32, Abb. 6 S. 33). Wie in der Einleitung gezeigt, ist für die Veränderungen des Tryptophan-Stoffwechsels beim Menschen die östrogene Komponente hormoneller Kontrazeptiva verantwortlich, Gestagene sind demgegenüber beim Menschen ohne Einfluß. Diese zunächst als Widerspruch zu den Befunden am Menschen erscheinenden Ergebnisse an der Ratte werden verständlich, wenn man berücksichtigt, daß Norethisteronacetat, obgleich es als Gestagen-Komponente in zahlreichen Kontrazeptiva enthalten ist, bei der Ratte in den hier verwendeten Dosierungen, eine stark inhärente östrogene Aktivität besitzt. Norethisteronacetat wird in vivo rasch enzymatisch, unter Freisetzung von Norethisteron, gespalten. Aus unveröffentlichten Untersuchungen von P. Jungblut, Wilhelmshaven, und K. Lübke, Schering AG, Berlin, geht hervor, daß Norethisteron an den zytoplasmatischen Östrogen-Rezeptor des Uterus gebunden wird, so daß die sogenannte inhärente Östrogen-Wirkung des Norethisteronacetats verständlich wird. Daraus folgt, daß die gleichsinnige Beeinflussung des Tryptophan-Stoffwechsels der Ratte durch Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat auf die östrogene Eigenschaft des Norethisteronacetats zurückzuführen ist.

In der Einleitung wurde beschrieben, daß die Östrogen-bedingten Veränderungen des Tryptophan-Stoffwechsels beim Menschen auf einen durch die Steroid-Applikation bedingten relativen Vitamin-B₆-Mangel zurückgeführt werden. Für die Richtigkeit dieser Annahme sprechen die Untersuchungen, in denen durch zusätzliche Vitamin-B₆-Verabreichungen die Veränderungen weitgehend aufgehoben wurden. Der unter einer Östrogen-Verabreichung beim Menschen besonders auffällige Anstieg der Xanthurensäure-Ausscheidung im Harn wurde auf eine stärkere Pyridoxalphosphat-Abhängigkeit der Kynureninase-Reaktion im

Vergleich zur Kynurenin-Transaminasereaktion zurückgeführt (s. Stoffwechselschema S. 3). Nach dieser Theorie ist es verständlich, daß es bei einem Östrogen-bedingten relativen Pyridoxalphosphat-Mangel zu einer Bevorzugung des Xanthurensäure-Acetalweges im Tryptophan-Belastungstest kommen kann.

Im Widerspruch dazu stehen aber ebenfalls in der Einleitung beschriebene Befunde, nach denen es im Tryptophan-Belastungstest unter exogener Östrogen-Zufuhr auch zu einem Anstieg der Metabolite des NAD^+ -Stoffwechselweges kommt. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene starke Abnahme der Chinolinsäure-Ausscheidung im Harn der unter exogenem Östrogen-Einfluß stehenden weiblichen Ratte im Tryptophan-Belastungstest stand zunächst im Einklang mit der vorstehend erwähnten Theorie der durch Östrogene besonders genannten Kynureninase-Reaktion. Wie aus dem Stoffwechselschema auf Seite 3 hervorgeht, mußte die Hemmung der bei diesem Schritt entstehenden 3-OH-Antanrilsäure auch zu einer verminderten Bildung von Chinolinsäure führen. Zum Nachweis der Bedeutung von Pyridoxalphosphat für den Abbau des Tryptophans bei der Ratte wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß einer Verabreichung des Vitamin- B_6 -Antagonisten L-Penicillamin auf das Tryptophan-Metabolitenspektrum im Harn untersucht. Die Gabe von L-Penicillamin führte zu den gleichen charakteristischen Veränderungen der prozentualen Verteilung der Tryptophan-Metabolite im Harn wie eine Östrogen-Behandlung. Bereits eine dreitägige Applikation von L-Penicillamin führte zu einer Verminderung der Chinolinsäure-Ausscheidung und zu einer entsprechenden relativen Vermehrung der mit II + III bezeichneten Tryptophan-Metabolite (Tab. IX S. 42). Daß die durch die L-Penicillamin-Verabreichung hervorgerufenen Veränderungen tatsächlich auf einen experimentell erzeugten Pyridoxalphosphat-Mangel zurückzuführen sind, wurde daran deutlich, daß sich der Effekt des L-Penicillamins durch eine gleichzeitige Gabe von Pyridoxin völlig aufheben ließ.

Es war sehr überraschend, daß bei den mit Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat sowie auch bei den mit den Einzelkomponenten behandelten Ratten die gleichzeitige Verabreichung hoher Pyridoxin-Dosen nicht zu einer Aufhebung der Steroid-bedingten Veränderungen des Tryptophan-Metabolitenspektrums im Harn führte (Tab. X S. 44, Abb. 11 S. 45, 12 S. 45, 13 S. 46). Da die zur völligen Aufhebung des L-Penicillamin-Einflusses auf den Tryptophan-Stoffwechsel der Ratte erforderlichen Pyridoxin-Dosen keinerlei Effekt auf die Östrogen-bedingten Veränderungen zeigten, mußte aus diesen Befunden geschlossen werden, daß für die Steroid-bedingte charakteristische Senkung der Chinolinsäure-Ausscheidung im Rattenharn ein Östrogen-bedingter latenter Mangel an Pyridoxalphosphat für die Kynureninase-Reaktion nicht allein verantwortlich sein konnte.

Bei den bisher diskutierten Untersuchungen wurden Äthinylöstradiol und/oder Norethisteronacetat in unphysiologisch hohen, pharmakologischen Dosierungen verabreicht. Zur Prüfung der Bedeutung der Sexualhormone unter physiologischen Bedingungen für den Tryptophan-Stoffwechsel der Ratte wurden Untersuchungen an weiblichen sowie an männlichen, an ovariectomierten und an schwangeren Ratten durchgeführt (Abb. 8 S. 37, Tab. VIII S. 38). Da bei intakten, ovariectomierten und trächtigen weiblichen Ratten keine signifikanten Unterschiede des Metabolitenspektrums im Harn im Tryptophan-Belastungstest feststellbar waren, mußte man folgern, daß unter den genannten physiologischen und experimentellen Veränderungen des Östrogenspiegels in vivo der Abbau einer unphysiologisch hohen Tryptophan-Belastungsdosis nicht signifikant beeinflusst wird. Der physiologische Anstieg des Östrogenspiegels bei trächtigen Ratten führt demnach offensichtlich nicht zu einem im Tryptophan-Belastungstest erkennbaren Pyridoxalphosphat-Mangelzustand. Der geringe Einfluß der endogenen Sexualhormone auf den Tryptophan-Stoffwechsel im Belastungstest zeigte sich ebenfalls in vergleichenden

Untersuchungen an weiblichen und männlichen Ratten (Abb. 7 S. 36). Als einziger Unterschied im Metabolitenspektrum im Harn weiblicher und männlicher Ratten war eine vermehrte Ausscheidung der mit IV bezeichneten radioaktiven Verbindungen bei weiblichen Ratten feststellbar.

In der Einleitung wurde darauf hingewiesen, daß in zahlreichen Arbeiten der Einfluß von Kortikosteroiden auf den Tryptophan-Stoffwechsel beschrieben wurde. Eine Kortikoid-Behandlung führt zu einer Induktion der Tryptophan-Pyrrolase und damit zu einer Aktivierung des initialen Stoffwechselschrittes. Da andererseits bekannt ist, daß Östrogene über eine Stimulation der Nebennierenrinden-Funktion zu einer vermehrten Kortikoid-Sekretion führen, lag die Annahme nahe, die in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen des Tryptophan-Stoffwechsels bei exogener Östrogenzufuhr indirekt über eine Beeinflussung der Nebennierenrinden-Funktion durch die östrogen-wirksamen Verbindungen zu erklären. Zur Prüfung des Einflusses der endogenen Kortikoide auf das Verteilungsmuster der Tryptophan-Metabolite im Harn wurden intakte und adrenaletomierte weibliche Ratten im Tryptophan-Belastungstest untersucht. Dabei ergab sich der überraschende Befund, daß bei adrenaletomierten weiblichen Ratten der prozentuale Anteil der Chinolinsäure im Harn, im Vergleich zu den anscheinoperierten Tieren erhaltenen Ergebnissen, signifikant anstieg, die mit II + III bezeichneten Metabolite aber im Mittel abnahmen (Abb. 9 S. 39). Die durch die Adrenaletomie hervorgerufenen Veränderungen des Tryptophan-Metabolitenspektrums im Harn konnten durch eine Substituierung der adrenaletomierten Tiere mit dem synthetischen Kortikoid Fluocortolon[®] völlig aufgehoben werden.

In den bisher diskutierten Untersuchungen wurde jeweils das Metabolitenspektrum im Harn der Ratte im Tryptophan-Belastungstest beschrieben. Im Hinblick auf die mögliche Bedeutung hormoneller Kontrazeptiva unter physiologischen Bedingungen

bezüglich der Belastung des Tryptophan-Abbauweges wurden Versuche durchgeführt, bei denen die mit Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat behandelten Ratten nur eine Tracerdosis von ^{14}C -Tryptophan erhielten (Abb. 4 S. 30). Unter diesen Bedingungen zeigte sich im Vergleich zu den im Tryptophan-Belastungstest erhaltenen Ergebnissen ein völlig anderes Verteilungsmuster der Tryptophan-Metabolite im Harn. Bei den nicht mit Steroiden behandelten Tieren der Kontrollgruppe entfielen auf die Chinolinsäure jetzt nur ca. 10 % der Gesamtradioaktivität im Harn, auf die Verbindungen II + III ca. 50 % und auf die Verbindungen IV ca. 40 %. Selbst eine vierzehntägige Behandlung mit hohen Dosen Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat führte unter diesen Bedingungen zu keiner signifikanten Veränderung des Metabolitenspektrums im Harn. Daraus folgt, daß bei physiologischen Tryptophan-Spiegeln im Organismus der Ratte die Chinolinsäure-Ausscheidung nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die im Organismus vorhandene Chinolinsäure-Konzentration muß durch die Relation der Neubildung aus 3-OH-Anthranilsäure und dem weiteren Abbau bestimmt sein. Wenn man unterstellt, daß die im Harn ausgeschiedene Chinolinsäure der im Organismus vorhandenen Chinolinsäure-Konzentration korreliert ist, dann könnte die im Tryptophan-Belastungstest festgestellte hohe Chinolinsäure-Ausscheidung darauf hindeuten, daß ihre weitere Metabolisierung durch die Nicotinamid-Ribonukleotid-Pyrophosphorylase bei sehr hohem Chinolinsäure-Angebot 'übersättigt' würde, so daß es zu einem Stau auf der Chinolinsäure-Ebene kommen würde. Die bei Verwendung einer Tracerdosis von ^{14}C -Tryptophan nur geringfügige Chinolinsäure-Ausscheidung im Harn könnte darauf hinweisen, daß die unter physiologischen Bedingungen im Intermediärstoffwechsel anfallende Chinolinsäure sehr rasch und überwiegend durch das vorstehend genannte Enzym weiter metabolisiert wird. Als weitere Möglichkeit für die im Belastungstest beobachtete, vorwiegende Chinolinsäure-Ausscheidung im Harn müßte eine begrenzte Kapazität der Picolinatcarboxylase diskutiert werden, da die Aktivität dieses Enzyms darüber entscheidet, in welchem Maße der

weitere Abbau der 3-OH-Anthranilsäure über die Chinolinsäure zu NAD^+ bzw. NADP^+ oder über die Glutarsäure zu CO_2 stattfindet. Bei einem Überangebot an 3-OH-Anthranilsäure könnte die Picolinatcarboxylase-Reaktion zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden und zu einer Einschleusung der 3-OH-Anthranilsäure in den Chinolinsäureweg führen.

Bei den bisher diskutierten Versuchen zum Tryptophan-Stoffwechsel der Ratte wurde ausschließlich die prozentuale Verteilung der im Harn ausgeschiedenen Tryptophan-Metabolite untersucht. Auf die ^{14}C -Ausscheidung im Stuhl wurde in dieser Arbeit nicht eingegangen, da in den einleitenden Versuchen an unbehandelten und mit Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat behandelten weiblichen Ratten gezeigt wurde, daß die über den Stuhl eliminierte ^{14}C -Aktivität im Tryptophan-Belastungstest nur etwa 1 % der applizierten Dosis betrug und daher vernachlässigt werden konnte.

Wie aus dem Stoffwechselschema auf Seite 3 zu ersehen ist und wie vorstehend auch schon erwähnt, entscheidet die Aktivität der Picolinatcarboxylase über das Ausmaß des Endabbaus von Tryptophan zu CO_2 . Die Bedeutung dieses Enzyms für den Tryptophan-Endabbau bei verschiedenen Species ergibt sich aus der in der Einleitung auf Seite 7 wiedergegebenen Tabelle III. Aus dieser Zusammenstellung folgt, daß Carboxy- ^{14}C -markierte 3-OH-Anthranilsäure durch Leberhomogenate verschiedener Species in sehr unterschiedlichem Ausmaß in Chinolinsäure überführt oder aber in der Picolinatcarboxylase-Reaktion unter Abspaltung von $^{14}\text{CO}_2$ decarboxyliert wird. Durch Leberhomogenate der Ratte wurden z. B. 80 % der eingesetzten ^{14}C -3-OH-Anthranilsäure in Chinolinsäure umgewandelt, wobei nur 12 % der ^{14}C -Aktivität als $^{14}\text{CO}_2$ auftraten. Im Gegensatz dazu wurden durch das Leberhomogenat der Katze nur 9 % der ^{14}C -3-OH-Anthranilsäure in Chinolinsäure umgewandelt, wogegen bei dieser Species 86 % der eingesetzten ^{14}C -Aktivität als $^{14}\text{CO}_2$ auftraten.

Über eine endokrinologische Beeinflussung der Picolinatcarboxylase wurde bisher nur von IKEDA et al. (37) und MEHLER et al. (38) berichtet. Nach diesen Untersuchungen ist bei diabetischen Ratten die Aktivität der Picolinatcarboxylase deutlich erhöht und als Folge davon die Synthese von NAD^+ über die Chinolinsäure vermindert. Durch Insulin-Substitution konnte diese Veränderung der Enzymaktivität der Picolinatcarboxylase wieder aufgehoben werden.

Vorstehend wurde diskutiert, daß eine im Tryptophan-Belastungstest erfolgende Sättigung des eventuell geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms Picolinatcarboxylase für die vermehrte Chinolinsäure-Ausscheidung nach Tryptophan-Belastung verantwortlich sein könnte.

Zur Untersuchung des Tryptophan-Endabbaus zu CO_2 wurde unter verschiedenen Bedingungen die $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung der Ratte über jeweils 9 Stunden nach Verabreichung des ^{14}C -markierten Tryptophans quantitativ bestimmt. Von nicht Steroid-behandelten Kontrolltieren wurden im Tryptophan-Belastungstest 9 Stunden insgesamt 35 % der verabreichten ^{14}C -Aktivität als $^{14}\text{CO}_2$ abgeatmet. Bei Verabreichung der ^{14}C -Tryptophan-Tracerdosis wurden dagegen nur ca. 10 % als $^{14}\text{CO}_2$ abgeatmet (Abb. 14 S. 51). Überraschenderweise führte eine Vorbehandlung mit Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat sowohl im Belastungstest als auch nach Applikation der Tryptophan-Tracerdosis zu einer signifikanten Steigerung der $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung: im Tryptophan-Belastungstest von 35 % auf ca. 43 %, bei Tracerdosis von 9 % auf ca. 16 %. Diese Befunde sprechen dafür, daß die Geschwindigkeit der die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung bestimmenden Picolinatcarboxylase-Reaktion durch die Behandlung mit Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat erhöht wird. Eine Aktivitätssteigerung der geschwindigkeitsbestimmenden Picolinatcarboxylase müßte bei einem Überangebot von 3-OH-Anthranilsäure zwingend den Tryptophan-Abbau vom Chinolinsäureweg in Richtung auf den Endabbau zu CO_2 lenken. Da, wie oben aufgezeigt, die Wirkung des Norethisteronacetats als Östrogen-

Wirkung verstanden werden kann, ist die Aussage erlaubt, daß offensichtlich eine Östrogen-Behandlung zu einer Bevorzugung des CO_2 -Endabbauweges führt. Dies würde zwanglos die im Tryptophan-Belastungstest beobachtete Verminderung der Chinolinsäure-Ausscheidung im Harn bei den mit Östrogenen behandelten Ratten erklären.

Wie weiter unten gezeigt wird, führt eine Behandlung mit Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat zu einer deutlichen Verminderung der mit dem Harn eliminierten ^{14}C -Aktivität im Tryptophan-Belastungstest. Die Abnahme der ^{14}C -Ausscheidung mit dem Harn bei Steroid-behandelten Ratten beträgt ca. 8 % der Eingabe. Wenn man damit die Steigerung der $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung um ca. 8 % bei den mit Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat behandelten Tieren vergleicht (Abb. 14 S. 51), dann erkennt man, daß die Gesamt- ^{14}C -Elimination über Harn und Atemluft konstant bleibt, nur daß etwa 8 % der applizierten ^{14}C -Gesamtaktivität statt über den Harn mit der Atemluft eliminiert werden.

Wie oben bereits dargelegt wurde, führte eine L-Penicillamin-Behandlung, ebenso wie die Behandlung mit Äthinylöstradiol und/oder Norethisteronacetat, zu einem starken Abfall der Chinolinsäure-Ausscheidung mit dem Harn. Der Einfluß des L-Penicillamins auf den Tryptophan-Stoffwechsel ließ sich durch die gleichzeitige Verabreichung von Pyridoxin verhindern, im Gegensatz zu den Östrogen-bedingten Veränderungen des Tryptophan-Stoffwechsels. Eine L-Penicillamin-Behandlung führte nun ganz im Gegensatz zu der Steroid-Behandlung zu einer sehr starken Verminderung der $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung im Tryptophan-Belastungstest (Abb. 15 S. 53). In dieser Versuchsserie wurden von den unbehandelten Kontrolltieren innerhalb 9 Stunden etwa 27 % der applizierten ^{14}C -Aktivität als $^{14}\text{CO}_2$ abgeatmet, von den mit L-Penicillamin behandelten Tieren im gleichen Zeitraum nur ca. 10 %. Wie in Tab. XI auf Seite 48 gezeigt wird, führt die L-Penicillamin-Verabreichung im

Mittel zwar zu einer geringfügigen, aber nicht signifikant verminderten ^{14}C -Ausscheidung mit dem Harn. Die starke Verminderung der $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung steht aber in keinerlei Zusammenhang mit der geringfügigen Veränderung der ^{14}C -Ausscheidung im Harn, so daß der Schluß nicht erlaubt sein kann, daß unter einer L-Penicillamin-Verabreichung zwar weniger $^{14}\text{CO}_2$ abgeatmet wird, dafür aber mehr ^{14}C -Aktivität mit dem Harn eliminiert wird.

Im Gegensatz zu den Steroid-behandelten Tieren ist die ^{14}C -Elimination mit der Atemluft und mit dem Harn bei L-Penicillamin behandelten Tieren quantitativ zwar verschiedenen, aber im Sinne einer Verminderung gleichsinnig verändert. Durch eine gleichzeitige Pyridoxin-Verabreichung konnte der L-Penicillamin-Effekt auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung aufgehoben werden (Abb. 15 S. 53). Die alleinige Verabreichung von Pyridoxin führte im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einer geringfügigen Steigerung der $^{14}\text{CO}_2$ -Ausatmung.

Der Vergleich der nach Östrogen-Behandlung und nach L-Penicillamin-Verabreichung erhaltenen Ergebnisse zeigt, daß der in beiden Fällen beobachteten starken Abnahme der Chinolinsäure-Ausscheidung im Harn im Tryptophan-Belastungstest völlig verschiedene Mechanismen zugrunde liegen müssen. Wie vorstehend bereits gesagt, führt die Östrogen-Behandlung zu einer Ablenkung des Tryptophan-Abbaus vom Chinolinsäureweg hin zum CO_2 -Endabbau. L-Penicillamin muß demgegenüber einen vorgelagerten Reaktionsschritt beeinflussen, und es liegt nahe, die L-Penicillamin-Wirkung über die Hemmung des Pyridoxalphosphats zu erklären, wobei die in stärkerem Maße Pyridoxalphosphat-abhängige Kynureninase-Reaktion besonders negativ beeinflußt wird. Für die Richtigkeit dieser Annahme spricht, daß der L-Penicillamin-Effekt durch gleichzeitige Pyridoxin-Applikation aufgehoben werden kann, daß unter der Behandlung mit L-Penicillamin sowohl die Chinolinsäure-Ausscheidung im Harn als auch die $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung sehr stark

reduziert werden und daß schließlich unter dem Einfluß von L-Penicillamin die in geringerem Maße Pyridoxalphosphat-abhängige Bildung von Kynurensäure und Xanthurensäure bevorzugt wird.

Wie oben bereits diskutiert wurde, war bei ovariectomierten und intakten weiblichen Ratten sowie bei männlichen Ratten praktisch kein Unterschied im ^{14}C -Tryptophan-Stoffwechsel nachweisbar, gemessen am Metabolitenspektrum im Harn. Das gleiche gilt auch für das Ausmaß der $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung im ^{14}C -Tryptophan-Belastungstest bei intakten und ovariectomierten weiblichen sowie bei männlichen Ratten (Abb. 16 S. 55). Die $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung betrug bei den drei untersuchten Gruppen im Mittel etwa 30 % der applizierten ^{14}C -Gesamtaktivität.

Aus den Untersuchungen zur Harnanalytik sowie zur $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung bei intakten und ovariectomierten weiblichen Ratten und bei männlichen Ratten folgt, daß Veränderungen des Spiegels der endogenen Sexualhormone nicht zu einer Verminderung oder Steigerung des Tryptophan-Umsatzes im Organismus führen.

Die Adrenalectomie weiblicher Ratten führte zu einer signifikanten Steigerung der Chinolinsäure-Ausscheidung im Harn im Tryptophan-Belastungstest (Abb. 9 S. 39). Überraschend wurde aber von den adrenalectomierten Tieren nach Tryptophan-Belastung deutlich weniger $^{14}\text{CO}_2$ abgeatmet als von scheinoperierten Kontrolltieren. Die Kontrolltiere eliminierten in 9 Stunden etwa 35 % der verabreichten ^{14}C -Aktivität als $^{14}\text{CO}_2$, die adrenalectomierten Tiere demgegenüber nur ca. 22 % (Abb. 17 S. 57). Im Gegensatz dazu wurde durch die Adrenalectomie im ^{14}C -Tryptophan-Belastungstest die ^{14}C -Gesamtelimination mit dem Harn in 24 Stunden von etwa 20 % bei den Kontrolltieren auf ca. 30 % der Eingabe erhöht. Aus diesen Befunden kann man ableiten, daß nach Adrenalectomie die verminderte $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung im Tryptophan-Belastungstest

offensichtlich durch eine entsprechend höhere ^{14}C -Elimination mit dem Harn etwa kompensiert wird. Ein Kortikoid-Mangel führt demnach zu einer Verminderung des Tryptophan-Endabbaus zu CO_2 und bei einem Überangebot von 3-OH-Anthranilsäure im Tryptophan-Belastungstest zu einer vermehrten Chinolinsäure-Bildung. Durch die Kortikoid-Substitution adrenaletomierter Ratten wird die verminderte $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung aufgehoben (Abb. 17 S. 57) und gleichzeitig die bei adrenaletomierten Tieren prozentual vermehrte Chinolinsäure-Ausscheidung im Harn auf normale Werte reduziert (Abb. 10 S.40).

Aus diesen Ergebnissen folgt, daß Kortikoide für die normale Aktivität der Picolinatcarboxylase notwendig sind. Wenn man nun berücksichtigt, daß Östrogen-Verabreichung zu einer erhöhten Kortikoid-Aktivität im Organismus führt, dann kann man die in dieser Arbeit beschriebene erhöhte $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung, bei gleichzeitig verminderter Chinolinsäure-Ausscheidung im Harn, zwanglos über eine Aktivitätssteigerung der Picolinatcarboxylase durch die Östrogen-bedingte Steigerung der Kortikoid-Sekretion erklären. Für eine physiologische Bedeutung der offensichtlich Kortikoid-abhängigen Picolinatcarboxylase-Reaktion spricht, daß eine Östrogen-Behandlung der weiblichen Ratte nicht nur im Tryptophan-Belastungstest, sondern auch bei Verabreichung einer ^{14}C -Tryptophan-Tracerdosis zu einer vermehrten $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung im Tryptophan-Endabbauweg führt. Der erstaunliche Befund, daß eine Kortikoid-Substitution adrenaletomierter Ratten zwar zu einer Normalisierung des Tryptophan-Metabolitenspektrums im Harn und der $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung führt, aber nicht zu einer Verminderung der bei adrenaletomierten Tieren beobachteten vermehrten ^{14}C -Gesamtelimination mit dem Harn, kann auf Grund der vorliegenden Untersuchungen nicht befriedigend gedeutet werden.

Es wurde vorstehend bereits darauf hingewiesen, daß die beim Menschen unter dem Einfluß hormoneller Kontrazeptiva beobachteten Veränderungen des Tryptophan-Metabolitenspektrums im

Harn auf die Östrogen-Komponente zurückzuführen sind. In den bisher diskutierten Versuchen wurde als Gestagen das Norethisteronacetat benutzt. Es wurde gleichzeitig darauf hingewiesen, daß diese Verbindung in hoher Dosierung eine starke östrogene Aktivität zeigt, durch die sich der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Einfluß des Norethisteronacetats auf den Tryptophan-Stoffwechsel erklären läßt. Im Gegensatz zu Norethisteronacetat sind Progesteron und D-Norgestrel als reine Gestagene anzusprechen, die auch bei sehr hoher Dosierung tierexperimentell keine östrogene Wirkung zeigen. Es soll hier noch einmal hervorgehoben werden, daß Östrogene über eine Stimulation und Biosynthese des ACTH die Funktion der Nebennierenrinde steigern und dadurch zu einer Erhöhung der Konzentration des freien und des gebundenen Kortisols im Plasma führen (64 - 67).

Es wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß die bei der Ratte unter dem Einfluß Östrogen-wirksamer Verbindungen auftretenden Veränderungen im Tryptophan-Stoffwechsel als indirekte Effekte über eine gesteigerte Kortikoid-Sekretion der Nebennierenrinde zu verstehen sind. Die vorstehend erwähnten reinen Gestagene Progesteron und D-Norgestrel besitzen nicht nur keine Östrogen-Wirkung, sondern zeigen auch auf Grund dieser fehlenden Östrogen-Wirkung keine indirekte Kortikoid-Wirkung (Befunde von F. Neumann und E. Gerhards, Schering AG, Berlin). Die reinen Gestagene Progesteron und D-Norgestrel sollten demnach keinen Einfluß auf das Tryptophan-Metabolitenspektrum im Harn der Ratte haben. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse (Tab. XIII S. 59) führen diese beiden Verbindungen im Tryptophan-Belastungstest nicht zu der für östrogene Verbindungen charakteristischen Verminderung der Chinolinsäure-Ausscheidung im Rattenharn. Im Gegensatz dazu wird aber durch das klinisch ebenfalls als reines Gestagen angesprochene Chlormadinonacetat die Chinolinsäure-Ausscheidung signifikant vermindert. Chlormadinonacetat besitzt tierexperimentell auch in hoher Dosierung keine östrogene Wirkung, so daß die durch

Chlormadinonacetat hervorgerufene Verminderung der Chinolinsäure-Ausscheidung der Ratte im Tryptophan-Belastungstest zunächst überrascht. Der Befund wird aber verständlich, wenn man berücksichtigt, daß zahlreiche Gestagene der 17α -acyloxy-Pregnanreihe bei hoher Dosierung eine deutliche Kortikoid-Eigenwirkung zeigen, die sich z. B. bei langfristiger Applikation hoher Dosen im Tierexperiment in einer Atrophie der Nebennierenrinde, bedingt durch eine Hemmung der ACTH-Sekretion, äußert. Vor diesem Hintergrund der inhärenten Kortikoid-Wirkung des Chlormadinonacetats wird der Einfluß dieses sogenannten 'reinen Gestagens' auf den Tryptophan-Stoffwechsel der Ratte verständlich. Diese Befunde mit Chlormadinonacetat, einem typischen Gestagen ohne östrogene Wirkung, unterstreichen die Aussage, daß die beschriebenen Veränderungen des Tryptophan-Stoffwechsels der Ratte nicht als direkte Östrogen-Wirkung verstanden werden können, sondern jeweils als indirekte oder direkte Kortikoid-Wirkung der Verbindungen Äthinylöstradiol, Norethisteronacetat und Chlormadinonacetat.

Zusammenfassend folgt aus den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen, daß, wie bereits in der Literatur beschrieben, der Tryptophan-Stoffwechsel der Ratte Vitamin-B₆-abhängig ist. Bei Belastung der Ratte mit hohen L-Tryptophan-Dosen besteht auch bei intakten, nicht Steroid-behandelten Tieren ein latenter Pyridoxalphosphat-Mangel für die an der Bildung harngängiger Tryptophan-Metabolite beteiligten Enzyme. Dies äußert sich in einem starken Anstieg der Ausscheidung von ^{14}C -Tryptophan-Metaboliten im Harn im Belastungstest an der intakten Ratte durch Vorbehandlung mit hohen Dosen Pyridoxin (Tab. XI S. 48). Der Hauptabbauweg des Tryptophans bei der Ratte verläuft über 3-OH-Anthranilsäure und Glutaryl-CoA zu CO_2 . Wenn man berücksichtigt, daß im Tryptophan-Belastungstest ca. 40 % der verabreichten Tryptophan-Dosis zu CO_2 abgebaut werden und daß von den mit dem Harn ausgeschiedenen insgesamt 20 % der Eingabe etwa die Hälfte auf die Chinolinsäure entfällt, dann wird deutlich,

daß die Kapazität des über die 3-OH-Anthranilsäure verlaufenden Abbauweges wesentlich höher ist als die Kapazität der zu Kynurensäure und Xanthurensäure führenden Wege. Bei Verabreichung einer ^{14}C -Tryptophan-Tracerdosis entfallen nur ca. 10 % der mit dem Harn insgesamt eliminierten ^{14}C -Tryptophan-Metabolite auf die Chinolinsäure, im Tryptophan-Belastungstest dagegen ca. 40 %. Dies macht deutlich, daß es im Tryptophan-Belastungstest zu einem Stau auf der Chinolinsäure-Ebene kommt und daß der weitere Abbau der Chinolinsäure nur eine begrenzte Kapazität besitzt, wobei eventuell der Nicotinamid-Ribonukleotid-Pyrophosphorylase eine den weiteren Chinolinsäure-Abbau bestimmende, geschwindigkeitsbegrenzende Bedeutung zukommen könnte.

Die Behandlung der Ratte mit Östrogen-wirksamen Verbindungen führt zu einer sehr komplexen Beeinflussung des Tryptophan-Stoffwechsels. Zunächst sollte man erwarten, daß durch die Östrogen-bedingte Erhöhung der Kortikoid-Sekretion der Nebennierenrinde die Tryptophan-Pyrrolase induziert und damit der initiale Abbauschritt des Tryptophans aktiviert wird. Im Widerspruch dazu stehen aber die in dieser Arbeit beschriebenen Befunde, nach denen der Gesamt- ^{14}C -Tryptophan-Umsatz, gemessen an der ^{14}C -Ausscheidung im Harn und der $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung, durch eine Verabreichung Östrogen-wirksamer Substanzen nicht erhöht wird. Dieser Befund wird aber verständlich, wenn man berücksichtigt, daß Östrogene zu einer vermehrten STH-Ausschüttung führen. STH vermindert die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase (68) und hemmt die Induktion dieses Enzyms durch Hydrokortison um ca. 70 % (69). Die fehlende Erhöhung des Gesamt-Tryptophan-Umsatzes unter dem Einfluß Östrogen-wirksamer Substanzen könnte demnach zwanglos über eine Hemmung der Kortikoid-bedingten Tryptophan-Pyrrolase-Stimulation durch das vermehrt sezernierte STH erklärt werden.

Unter dem Einfluß Östrogen-wirksamer Verbindungen nimmt im Tryptophan-Belastungstest die Gesamt- ^{14}C -Ausscheidung im Harn ab. Es wurde gezeigt, daß diese Abnahme der Gesamt- ^{14}C -Aus-

scheidung im Harn durch die starke Verminderung der Chinolinsäure-Elimination bedingt ist; die Abatmung von $^{14}\text{CO}_2$ nimmt bei Östrogen-behandelten Ratten entsprechend der Verminderung der ^{14}C -Gesamtelimination mit dem Harn zu. Die Abnahme der Chinolinsäure-Konzentration im Harn führt bei einer absolut geringeren ^{14}C -Gesamtausscheidung im ^{14}C -Tryptophan-Belastungstest zu einem relativen Anstieg der anderen harngängigen Metabolite des Tryptophans, wie Kynurensäure, Xanthurensäure, Anthranilsäure und 3-OH-Anthranilsäure.

Die Versuche an adrenaletomierten Ratten zeigten, daß die Aktivität der Picolinatcarboxylase Kortikoid-abhängig ist, wobei es aber offen bleibt, ob die Kortikoid-Wirkung auf dieses Enzym einer Aktivierung oder einer Enzyminduktion entspricht. Die Aktivität der Picolinatcarboxylase entscheidet darüber, ob die 3-OH-Anthranilsäure sowohl im Tryptophan-Belastungstest als auch bei Verabreichung einer Tracerdosis von ^{14}C -Tryptophan über Chinolinsäure zu NAD^+ oder aber Glutaryl-CoA in CO_2 überführt wird. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung wurde nämlich bei Östrogen-behandelten Ratten sowohl nach einer Tracerdosis von ^{14}C -Tryptophan als auch im Tryptophan-Belastungstest signifikant erhöht.

Wie gezeigt wurde, kann die Beeinflussung des Tryptophan-Stoffwechsels der Ratte durch Äthinylöstradiol einheitlich über eine Stimulation der Picolinatcarboxylase mit entsprechender Verminderung der Chinolinsäure-Ausscheidung im Harn und gleichzeitiger Erhöhung der $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung erklärt werden. Dabei wirken Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat als Östrogen-wirksame Verbindungen über eine vermehrte Kortikoid-Sekretion der Nebennierenrinde auf die Picolinatcarboxylase ein, Chlormadinonacetat dagegen wirkt direkt auf Grund seiner inhärenten Kortikoid-Wirkung. Die Bedeutung des Kortikoid-Einflusses auf die Picolinatcarboxylase-Aktivität zeigt sich auch in Untersuchungen von GREENGARD et al. zur hormonellen Regulation der NAD^+ -Biosynthese (70, 71). Die Autoren zeigten, daß die durch die Hypophysektomie bedingte indirekte

funktionelle Adrenalektomie der Ratte zu einem Anstieg der NAD^+ -Konzentration in der Leber führte und daß dieser Effekt durch Kortikoid-Substitution aufgehoben werden konnte. Aus den beschriebenen Versuchen geht hervor, daß die Veränderungen des ^{14}C -Tryptophan-Stoffwechsels der Ratte unter dem Einfluß Östrogen-wirksamer Steroide sowie unter dem Einfluß von Steroiden mit einer inhärenten Kortikoid-Wirkung offensichtlich nicht über einen Steroid-bedingten Pyridoxalphosphat-Mangel zu erklären sind. Für die Richtigkeit dieser Annahme sprechen auch die Ergebnisse orientierender Versuche an der weiblichen Ratte zur $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung nach oraler Verabreichung von Carboxyl- ^{14}C -markiertem L-Leucin. Die initiale, zu $^{14}\text{CO}_2$ führende Decarboxylierungsreaktion des L-Leucins wurde im L-Leucin-Belastungstest durch Vorbehandlung der Ratten mit hohen Dosen des dabei Östrogen-wirksamen Norethisteronacetats überhaupt nicht beeinflusst (Abb. 18 S. 62, Abb. 19 S. 64).

Vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit mitgeteilten Befunde müssen die aus der Analyse einiger Tryptophan-Metabolite im Harn im Tryptophan-Belastungstest beim Menschen gezogenen weitgehenden Schlüsse auf einen Östrogen-bedingten latenten Pyridoxalphosphat-Mangel bei Anwendung hormoneller Kontrazeptiva in Frage gestellt werden.

BROWN et al. (46, 72) fanden bei schwangeren Frauen und bei Frauen unter Einfluß oraler Kontrazeptiva keinen Einfluß auf die Ausscheidung von Anthranilsäure-Metaboliten und auch keine Veränderung bei zusätzlicher Vitamin- B_6 -Supplementation. Darüber hinaus fand ROSE (44) beim Menschen, daß im Tryptophan-Belastungstest unter Einfluß oraler Kontrazeptiva die Ausscheidung der 3-OH-Anthranilsäure vermehrt war. Dieser Befund zeigt, daß beim Menschen die Pyridoxalphosphat-abhängige Kynureninase-Aktivität durch hormonelle Kontrazeptiva nicht negativ beeinflusst wird. Da in den von ROSE beschriebenen Untersuchungen eine zusätzliche Verabreichung von Vitamin B_6 zu einem Abfall der erhöhten Ausscheidung von 3-OH-Anthranilsäure führte, muß man schließen, daß im Tryptophan-Belastungs-

test beim Menschen eine hinter der 3-OH-Anthranilsäure liegende Pyridoxalphosphat-abhängige Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist. Da bei Vitamin-B₆-Mangelzuständen des Menschen im Tryptophan-Belastungstest vermehrt Chinolinsäure ausgeschieden wird, liegt es nahe, die durch die Picolinat-carboxylase katalysierte Decarboxylierungsreaktion als diesen eventuell Pyridoxalphosphat-abhängigen, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zu betrachten.

Es gibt noch zahlreiche andere experimentelle Befunde, die zeigen, daß die beim Menschen durch hormonelle Kontrazeptiva oder alleinige Östrogen-Verabreichung hervorgerufenen Veränderungen des Tryptophan-Stoffwechsels nicht im Sinne eines Steroid-bedingten Pyridoxalphosphat-Mangels interpretiert werden können. Eine ausführliche Zusammenstellung der bisher in der Literatur erhobenen Befunde findet sich bei H. WOLF (19).

Untersuchungen am Menschen bei Verwendung von ¹⁴C-markiertem Tryptophan sind erforderlich, um den Einfluß verschiedener endokriner Bedingungen auf den Tryptophan-Stoffwechsel zu prüfen, da nur so eine quantitative Aussage über die Gesamtausscheidung sowie über das Metabolitenspektrum im Harn und über das Ausmaß der ¹⁴CO₂-Abatmung möglich wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluß verschiedener endokriner Bedingungen auf den Tryptophan-Stoffwechsel der Ratte untersucht.

Nach oraler Verabreichung einer Tracerdosis [^{14}C]-DL-Tryptophan allein oder in Verbindung mit einer L-Tryptophan-Belastungsdosis von 30 mg/100 g KG wird neben dem ^{14}C -Tryptophan-Metabolitenspektrum und der ^{14}C -Gesamtelimination im Harn auch die $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung gemessen. Es wird dabei gezeigt, daß die Ratte im Tryptophan-Belastungstest Chinolinsäure als Hauptmetaboliten ausscheidet; demgegenüber spielt die Chinolinsäure-Ausscheidung unter physiologischen Tryptophan-Spiegeln im Organismus der Ratte nur eine untergeordnete Bedeutung. Unter physiologischen und experimentellen Bedingungen (z. B. Ovariectomie) läßt sich kein Einfluß der endogenen Sexualhormone auf den Abbau einer Tryptophan-Belastungsdosis nachweisen.

Es wird gezeigt, daß es bei weiblichen Ratten durch eine Behandlung mit Östrogen-wirksamen Verbindungen zu einer deutlichen Verminderung der Chinolinsäure-Ausscheidung und der ^{14}C -Gesamtelimination mit dem Harn bei gleichzeitiger dementsprechender Vermehrung der $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung kommt. Diese Wirkungen können bei Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat sowie bei Chlormadinonacetat nachgewiesen werden. Progesteron und D-Norgestrel zeigen keine Auswirkung auf die ^{14}C -Gesamtelimination und die Chinolinsäure-Ausscheidung im Harn.

Die durch Äthinylöstradiol und Norethisteronacetat bedingte Beeinflussung des Tryptophan-Stoffwechsels der Ratte wird durch eine indirekte Stimulation der Picolinatcarboxylase erklärt. Die Wirkung von Chlormadinonacetat wird auf eine direkte Kortikoid-Wirkung zurückgeführt.

Versuche an adrenaletomierten weiblichen Ratten zeigen, daß die Aktivität der Picolinatcarboxylase Kortikoid-abhängig ist, wobei es sich aber auch herausstellt, daß eine Substitution mit dem synthetischen Kortikoid Fluocortolon[®] bei adrenaletomierten Ratten zwar zu einer Normalisierung des Tryptophan-Metabolitenspektrums im Harn und der $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung führt, aber nicht zu einer Verminderung der bei adrenaletomierten, nicht Kortikoid-substituierten Ratten beobachteten vermehrten ^{14}C -Gesamtelimination mit dem Harn.

Es zeigt sich, daß, wie bereits in der Literatur beschrieben, der Tryptophan-Stoffwechsel der Ratte Vitamin B_6 abhängig ist. Durch Gabe von L-Penicillamin erzeugter experimenteller Vitamin- B_6 -Mangel führt zu einer deutlichen Verminderung der Chinolinsäure-Ausscheidung im Harn und zu einer Verminderung der $^{14}\text{CO}_2$ -Abatmung.

Diese Effekte sind durch gleichzeitige Vitamin- B_6 -Gaben reversibel, was für eine durch Vitamin- B_6 -Mangel bedingte negative Beeinflussung der Kynureninase-Reaktion spricht.

Untersuchungen am Menschen bei Verwendung von ^{14}C -markiertem Tryptophan sind erforderlich, um den Einfluß verschiedener endokriner Bedingungen auf den Tryptophan-Stoffwechsel zu prüfen.

5. LITERATUR

1. KREHL, W.A., TEPLY, L.J., SARMA, P.S. und ELVEHJEM, C.A.
Clin. Sci. 101, 489 (1945)
2. NISHIZUKA, J. und HAYAISHI, O.
J. Biol. Chem. 238, 3369 (1963)
3. LEPKOVSKY, S. und NIELSEN, E.
J. Biol. Chem. 144, 135 (1942)
4. LEPKOVSKY, S., ROBOZ, E. und HAAGEN-SMIT, A.J.
J. Biol. Chem. 149, 195 (1943)
5. GREENBERG, L.D., BOHR, D.F., McGRATH, H. und RINEHART, J.F.
Arch. Biochem. 21, 237 (1949)
6. BAKER, E.M., CANHAM, J.E., NUNES, W., SAUBERLICH, H.E.
und McDOWELL, M.E.
Am. J. Clin. Nutr. 15, 59 (1964)
7. YESS, N., PRICE, J.M., BROWN, R.R., SWAN, P.B. und
LINKSWILER, H.
J. Nutr. 84, 229 (1964)
8. CHESLOCK, K.E. und McCULLY, M.T.
J. Nutr. 70, 507 (1960)
9. KOWLESSAR, O.D., HAEFFNER, L.J. und BENSON, G.D.
J. Clin. Invest. 43, 894 (1964)
10. MICHAEL, A.F., DRUMMOND, K.N., DOEDEN, D., ANDERSON, J.A.
und GOOD, R.A.
J. Clin. Invest. 43, 1730 (1964)

11. ROSE, D.P. und MCGINTY, F.
Clin. Sci. 35, 1 (1968)
12. OGASAWARA, N., HAGINO, Y. und KOTAKE, Y.
J. Biochem. (Tokyo) 52, 162 (1962)
13. WISS, O. und WEBER, F.
Med. J. Osaka Univ. 8, Suppl. 41 (1958)
14. WEBER, F. und WISS, O.
Z. Physiol. Chem. 331, 124 (1963)
15. PRICE, J.M., BROWN, R.R. und LARSON, F.C.
J. Clin. Invest. 36, 1600 (1957)
16. KRING, J.P., EBISUZAKI, K., WILLIAMS, J.N. (jr.)
und ELVEHJEM, C.A.
J. Biol. Chem. 195, 591 (1952)
17. BROWN, R.R., YESS, N. PRICE, J.M., LINKSWILER, H.,
SWAN, P. und HANKES, L.V.
J. Nutr. 87, 419 (1965)
18. ROSE, D.P. und MCGINTY, F.
In: Advances in Steroid Biochem. and Pharmacol.
Ed.: Briggs, M.H. 1, 97 (1970)
Academic Press, London - New York
19. WOLF, H.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33, Suppl. 136 (1974)
20. BENASSI, C.A.
Rec. Progr. Org. Med. Chem. 1, 45 (1964)

21. PRICE, J.M. BROWN, R.R. und YESS, N.
In: Advances in Metabolic Disorders
Eds.: Levine, R. und Luft, R., Vol. II, 159
Academic Press, New York
22. HENDERSON, L.M. und HANKES, L.V.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70, 26 (1949)
23. HENDERSON, L.M. und HIRSCH, H.M.
J. Biol. Chem. 181, 667 (1949)
24. HANKES, L.V. und HENDERSON, L.M.
J. Biol. Chem. 225, 349 (1957)
25. SUHADOLNIK, R.J., STEVENS, C.O., DECKER, R.H.,
HENDERSON, L.M. und HANKES, L.V.
J. Biol. Chem. 228, 973 (1957)
26. BROWN, R.R. und PRICE, J.M.
J. Biol. Chem. 219, 985 (1956)
27. KNOX, W.E. und MEHLER, A.H.
J. Biol. Chem. 187, 419 (1950)
28. KNOX, W.E. und MEHLER, A.H.
Science, 113, 237 (1951)
29. GESCHWIND, I.I. und LI, C.H.
Nature 172, 732 (1953)
30. THOMSON, J.F. und MIKUTA, E.T.
Endocrinology, 55, 232 (1954)
31. KNOX, W.E. und AUERBACH, V.H.
J. Biol. Chem. 214, 307 (1955)

32. CIVEN, M. und KNOX, W.E.
J. Biol. Chem. 234, 1787 (1959)
33. GREENGARD, O., SMITH, M.A. und ACS, G.
J. Biol. Chem. 238, 1548 (1963)
34. HUDSON, J., GREENGARD, O. und LISCO, H.
Cancer Res. 27, 2003 (1967)
35. CSANYI, V. und GREENGARD, O.
Arch. Biochem. Biophys. 125, 824 (1968)
36. HARDING, H.R. und ROSEN, F.
Fedn. Proc. Fedn. Am. Soc. Exp. Biol. 22, 409 (1963)
37. IKEDA, M. TSUJI, H., NAKAMURA, S., ICHiyAMA, A.,
NISHIZUKA, Y. und HAYAISHI, O.
J. Biol. Chem. 240, 1395 (1965)
38. MEHLER, A.H., McDANIEL, E.G. und HUNDLEY, J.
J. Biol. Chem. 232, 331 (1958)
39. AURICCHIO, S., RIGILLO, N. und DI TORO, R.
Minerva paediat. 12, 1463 (1960)
40. GREENGARD, P., KALINSKY, H.J. und MANNING, T.J.
Biochim. Biophys. Acta, 20, 198 (1968)
41. ROSE, D.P.
Brit. Med. J. 1, 1432 (1965)
42. ROSE, D.P.
Nature (Lond.) 210, 196 (1966)
43. PRICE, J.M., THORTON, M.J. und MUELLER, L.M.
Amer. J. Clin. Nutr. 20, 452 (1967)

44. ROSE, D.P.
Clin. Sci. 31, 265 (1966)
45. HEILMANN, H.H., KNAPP, A., STOLP, A. und
v. SUDHODOLETZ, O.
Klin. Wschr. 19, 1059 (1968)
46. BROWN, R.R., ROSE, D.P., PRICE, J.M. und WOLF, H.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 166, 44 (1969)
47. TOSELAND, P.A. und PRICE, S.A.
Brit. Med. J. 1, 777 (1969)
48. ROSE, D.P.
J. Clin. Path. 23, Suppl. [Ass. Clin. Path.] 3, 37 (1969)
49. LUHBY, A.L., BRIN, M., GORDON, M., DAVIS, P.,
MURPHY, M. und SPIEGEL, H.
Amer. J. Clin. Nutr. 24, 684 (1971)
50. MOURSI, G.E., ABDEL-DAIM, M.H., KELADA, N.L.
ABDEL-TAWAB, G.A. und GIRGIS, L.H.
Bull. Wld. Hlth. Org. 43, 651 (1970)
51. ROSE, D.P., BROWN, R.R. und PRICE, J.M.
Nature 219, 1259 (1968)
52. WOLF, H.
Acta Endocr. (Kbh.) Suppl. 138, 34 (1969)
53. ROSE, D.P. und ADAMS, P.W.
J. Clin. Path. 25, 252 (1972)
54. ROSE, D.P. und ADAMS, P.W.
J. Obstet. Gynaecol. Brit. Commonw. 80, 1; 82 (1973)

55. ROSE, D.P. und TOSELAND, P.A.
Metabolism 22, 2: 165 (1973)
56. WOLF, H., BROWN, R.R., PRICE, J.M. und MADSEN, P.O.
J. Clin. Endocrinol. 31, 4, 397 (1970)
57. ROSE, D.P. und BRAIDMAN, I.P.
Amer. J. Clin. Nutr. 24, 6, 673 (1971)
58. PRICE, J.M. THORTON, M.J. und MUELLER, L.M.
Amer. J. Clin. Nutr. 20, 452 (1967)
59. WOLF, H., PRICE, J.M., BROWN, R.R. und MADSEN, P.O.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 25, 237 (1970)
60. McGINTY, F. und ROSE, D.P.
Life Sci. 8, 1193 (1969)
61. GLUECKSOHN-WAELSCH, S., GREENGARD, P., QUINN, G.P.
und TEICHER, L.S.
J. Biol. Chem. 242, 1271 (1967)
62. HUFF, S.D. und CHAYKIN, S.
J. Biol. Chem. 242, 1265 (1967)
63. HANKES, L.V., BROWN, R.R., LEKLEM, J.E.
und SCHMAELER, M.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 1239 (1970)
64. GEMZELL, C.A.
Acta Endocrinol. (Kbh.) 11, 221 (1952)
65. SANDBERG, A.A., ROSENTHAL, H.E. und SLAUNWHITE, W.R. (jr.)
In: Metabolic Effects of Gonadal Hormones and
Contraceptive Steroids
Ed.: Salhanick, H.A. (Seite 367)
Plenum Press, New York (1969)

66. GERHARDS, E. und SCHILLINGER, E.
In: Nebenwirkungen kontrazeptiver Steroide
Ed.: Kewitz, H. (Seite 62)
Westkreuz-Verlag, Berlin (1971)
67. SCHILLINGER, E. und GERHARDS, E.
Biochem. Pharmacol. 22, 1835 (1973)
68. FRIEDEN, E., WESTMARCK, G.W. und SHORE, J.M.
Arch. Biochem. 92, 176 (1961)
69. ROSEN, F. und NICHOL, C.A.
Vitam. and Hormones 21, 135 (1963)
70. GREENGARD, P., QUINN, G.P. und LANDRAU, M.A.
Biochim. Biophys. Acta 47, 614 (1961)
71. GREENGARD, P., QUINN, G.P. und REID, M.B.
J. Biol. Chem. 239, 1887 (1964)
72. BROWN, R.R., THORTON, M.J. und PRICE, J.M.
J. Clin. Invest. 40, 617 (1961)

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. E. Gerhards in den Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin/Bergkamen, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Gerhards danke ich für die Überlassung des Themas sowie für sehr wertvolle Gespräche und Anregungen.

Mein Dank gilt allen, die mir durch die Ratschläge die Arbeit erleichterten, ganz besonders Fräulein H. Otto und Herrn Irrgang.

LEBENS LAUF

24.3.1948 geboren in Göttingen, BRD

1954 Eintritt in die Volksschule

1962 Beendigung der Volksschule

1964 Beendigung der 2jährigen Handelsschule

1966 Erlangung der Mittleren Reife an der
Mittelschule Weende in Göttingen

1969 Abitur am Felix-Klein-Gymnasium
in Göttingen

1969 Medizin-Studium an der Freien Universität
bis 1975 Berlin; dort Medizinisches Staatsexamen

seitdem Tätigkeit als Medizinalassistent

